

P. 192  
N° 3 B.

MARS

1912.

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES

DE CRACOVIE

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

ANZEIGER

DER

AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN

IN KRAKAU

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE KLASSE

REIHE B: BIOLOGISCHE WISSENSCHAFTEN



CRACOVIE

IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ

1912



rcin.org.pl



L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE A ÉTÉ FONDÉE EN 1873 PAR  
S. M. L'EMPEREUR FRANÇOIS JOSEPH I.

PROTECTEUR DE L'ACADÉMIE:

S. A. I. L'ARCHIDUC FRANÇOIS FERDINAND D'AUTRICHE-ESTE.

VICE-PROTECTEUR: *Vacat.*

PRÉSIDENT: S. E. M. LE COMTE STANISLAS TARNOWSKI.

SECRÉTAIRE GÉNÉRAL: M. BOLESŁAS ULANOWSKI.

EXTRAIT DES STATUTS DE L'ACADÉMIE:

(§ 2). L'Académie est placée sous l'auguste patronage de Sa Majesté Impériale Royale Apostolique. Le Protecteur et le Vice-Protecteur sont nommés par S. M. l'Empereur.

(§ 4). L'Académie est divisée en trois classes:

- a) Classe de Philologie,
- b) Classe d'Histoire et de Philosophie,
- c) Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles.

(§ 12). La langue officielle de l'Académie est la langue polonaise.

*Depuis 1885, l'Académie publie le «Bulletin International» qui paraît tous les mois, sauf en août et septembre. Le Bulletin publié par les Classes de Philologie, d'Histoire et de Philosophie réunies, est consacré aux travaux de ces Classes. Le Bulletin publié par la Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles paraît en deux séries. La première est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série contient les travaux qui se rapportent aux Sciences Biologiques.*

Publié par l'Académie  
sous la direction de M. **Ladislav Kulczyński**,  
Membre délégué de la Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles.

30 kwietnia 1912.

Nakładem Akademii Umiejętności.

Kraków, 1912. — Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządkiem Józefa Filipowskiego.



alle von mir untersuchten *Hydrangea*-Arten haben normale Spaltöffnungen, nur *Hydrangea quercifolia* besitzt Spaltöffnungen vom neuen Typus.

Klimatische Verhältnisse des Standortes verändern nicht wesentlich den Spaltöffnungstypus; ich konnte mich in vielen Fällen überzeugen, daß ein und dieselbe Art, welche unter so verschiedenen klimatischen Bedingungen, wie in Graz, Kew, Berlin, Dorpat gezogen wurde, dennoch den allgemeinen Bautypus der Spaltöffnungen nicht veränderte.

Der oben beschriebene Spaltöffnungstypus ist neu und in der botanischen Literatur nicht berücksichtigt worden. Er wird nirgends erwähnt, weder von Solereder<sup>1)</sup> und Engler<sup>2)</sup>, noch in Spezialarbeiten über die Anatomie der *Saxifragaceen*, wie z. B. von Thouvenin<sup>3)</sup>, Leist<sup>4)</sup>, Holle<sup>5)</sup> und Rosendahl<sup>6)</sup>. Wenn auch in allen diesen Arbeiten die Besonderheiten des anatomischen Baues der *Saxifragaceen* berücksichtigt werden, so finden die Spaltöffnungen wenig Beachtung, und wenn sie einmal erwähnt werden, so beschränkt man sich darauf, ihre Verteilung auf der Blattoberfläche zu untersuchen, ohne den feineren anatomischen Bau zu berücksichtigen. Die Abbildungen bei einigen Autoren zeigen uns, daß die Spaltöffnungen vom neuen Typus ihrer Aufmerksamkeit nicht entgangen sind, da aber dieser Typus bei den von ihnen untersuchten Pflanzen noch nicht genügend ausgeprägt ist, so wurde er wenig beachtet. In der Arbeit von Thouvenin (a. a. O. Taf. 9, Fig. 8) ist eine Spaltöffnung des Stengels von *Astilbe rivularis* abgebildet, deren Bau dem oben beschriebenen sehr nahe kommt. Auf Taf. 16, Fig. 6 ist ganz richtig der Spaltöffnungsapparat bei *Carpenteria californica* wiedergegeben, leider ist die Zeichnung zu klein gehalten.

<sup>1)</sup> H. Solereder. Systematische Anatomie der Dikotylen. Stuttgart 1899. Ergänzb. 1908.

<sup>2)</sup> A. Engler. *Saxifragaceae*. — Engler und Prantl. Die natürlichen Pflanzenfamilien. III, 2 a, S. 41 ff.

<sup>3)</sup> M. Thouvenin. Recherches sur la structure des *Saxifragacées*. — Ann. d. Sc. Natur. VII Sér., T. 12, Paris 1890.

<sup>4)</sup> Leist. Beiträge zur vergleichenden Anatomie der *Saxifrageen*. — Bot. Zentrbl. XLIII. 1890.

<sup>5)</sup> Holle. Beiträge zur Anatomie der *Saxifragaceen* und deren systematische Verwertung. — Bot. Zentrbl. LIII. 1893.

<sup>6)</sup> Rosendahl. Die nordamerikanischen *Saxifraginae* und ihre Verwandtschafts-Verhältnisse. — Engler's Bot. Jahrbücher. Bd. 37. 1906.



ten, so daß man den neuen Typus nicht deutlich genug erkennen kann. In der Arbeit von Kudelka<sup>1)</sup> ist eine ganze Reihe von Spaltöffnungsquerschnitten bei *Ribes* abgebildet (Taf. III, Fig. 10; Taf. IV, Fig. 28, 29, 35; Taf. V, Fig. 40, 47). Einige von diesen (Fig. 10, 29), besonders aber Fig. 47 zeigen ganz klar den Bau der Spaltöffnungen des neuen Typus. Der Verfasser schenkte ihm keine weitere Beachtung.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß der bei *Rodgersia tabularis* sehr gut ausgebildete neue Typus nicht vereinzelt in dieser Familie dasteht, sondern, daß er auch bei anderen ihrer Vertreter vorkommt und daß eine ganze Reihe verschiedener Übergangsformen vom normalen zum neuen Typus vorhanden ist.

Um mich zu überzeugen, wie sehr dieser neue Typus verbreitet ist, habe ich verschiedene Vertreter der mit den Saxifragaceen nahe verwandten Familien untersucht.

#### Spaltöffnungsapparat bei anderen Rosales.

Es wurden folgende Pflanzenarten anatomisch untersucht:

##### Crassulaceae.

*Sedum maximum* Suter (Graz),

*Sedum Aizoon* L. (Berlin) und

*Sempervivum globiferum* L. (Berlin): Spaltöffnungsapparat normal auf beiden Blattseiten.

##### Cunoniaceae.

*Cunonia capensis* L. (Berlin). Unterseite. Neuer Typus. (Taf. V, Fig. 46).

*Weinmania sylvicola* Cav. (Kew). Unterseite. Neuer Typus. (Taf. VI, Fig. 55).

<sup>1)</sup> W. Kudelka. Anatomia porównawcza organów odżywczych porzeczek (*Ribes*). — Rozpr. Wydz. Matem.-Przyrod. Akad. Um. Kraków. T. VII B. 1907. S. 51—134. M. drei Tafeln.

W. Kudelka. Vergleichende Anatomie der vegetativen Organe der Johannisbeerengewächse (*Ribes*). — Bulletin Intern. de l'Acad. d. Sc. d. Cracovie. 1907. Nr. 1. S. 24—40.



## Pittosporaceae.

*Pittosporum eugenioides* Cunn. (Berlin) und  
*Pittosporum tenuifolium* Gärtn. (Berlin): Unterseite. Normaler  
 Typus.

## Hamamelidaceae.

*Liquidambar orientalis* Mill. (Kew). Unterseite. Normaler Typus;  
 Hinterhof etwas niedriger als der Vorhof.

*Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. (Kew),  
*Parrotia Jacquemontiana* Decn. (Kew) und  
*Corylopsis spicata* Sieb. et Zucc. (Berlin): Unterseite. Normaler  
 Typus.

*Sycopsis sinensis* Oliver (Kew). Unterseite. Vorhof trichterförmig  
 verbreitert, Hinterhof viel kleiner.

*Hamamelis japonica* Sieb. et Zucc. (Kew) und  
*Trichocladus crinitus* Pers. (Berlin): Unterseite. Normal.

## Bruniaceae.

*Berzelia lanuginosa* (L.) Brongn. (Berlin). Die *Erica*-ähnlichen  
 Blätter haben stark xerophile Struktur. Der Spaltöffnungsapparat  
 mit stark erweitertem Vorhof, langer, schmaler Spalte und mit  
 zweitem Verschluss durch die nach unten gedrückten Nebenzellen.  
 (Taf. IV, Fig. 30).

## Platanaceae.

*Platanus orientalis* L. (Berlin). Unterseite. Bei alten Blättern ist  
 der Spaltöffnungsapparat dem *Rodgersia*-Typus ähnlich, aber nicht  
 so scharf ausgeprägt (Taf. VI, Fig. 49).

## Rosaceae.

*Aruncus silvestris* Kostel. (Graz und Steirische Alpen: Hoch-  
 lantsch). Unterseite. Spaltöffnungsapparat ganz normal. Es war in-  
 teressant, diese Pflanze mit *Astilbe* zu vergleichen, da der Habitus  
 beider Pflanzen ähnlich ist. Die Spaltöffnungen unterscheiden sich  
 aber wesentlich (Taf. VI, Fig. 53).

Der neue Typus der Spaltöffnungen wurde also außer bei Sa-  
 xifragaceen nur noch bei zwei Familien gefunden, nämlich bei *Cu-*



*noniaceae* (*Cunonia capensis* und *Weinmania sylvicola*) und bei *Platanaceae* (*Platanus orientalis*).

### Die Entstehung der Spaltöffnungen des neuen Typus.

Um zu verfolgen, wie die Spaltöffnungen des neuen Typus entstehen, habe ich junge Blätter zweier Vertreter der Saxifragaceen, bei denen dieser Typus sehr gut ausgebildet ist, nämlich *Rodgersia tabularis* und *Brevia madagascariensis* untersucht. *Rodgersia tabularis* besitzt eine interessante Eigentümlichkeit, ähnlich der von Borodin<sup>1)</sup> bei *Chrysosplenium* festgestellten, man findet nämlich auf ein und demselben Stückchen des Blattes Spaltöffnungen in sehr verschiedenen Entwicklungsstadien. Zusammen mit vollständig entwickelten, breit geöffneten Spaltöffnungen findet man kaum erst angelegte. An ein und demselben Epidermisfragmente eines jungen Blattes kann man alle Stadien beobachten, angefangen von den noch ungeteilten Mutterzellen bis zu vollständig ausgebildeten Spaltöffnungen (Taf. VI, Fig. 50, 54). Darum können wir auf Querschnitten durch ein junges Blatt von *Rodgersia tabularis* verschiedene Entwicklungsstadien der Spaltöffnungen erhalten, wie man das auf beigehefteten Abbildungen sieht. Auf Taf. VI, Fig. 56 sehen wir nur eine Zelle, aus der die Spaltöffnung entsteht; Figur 57 zeigt uns die Teilung dieser Zelle in zwei Schließzellen, Fig. 58 eine fertige junge Spaltöffnung, die sich noch stark von den Spaltöffnungen alter Blätter unterscheidet. Sie erhebt sich sehr wenig über die Oberfläche des Blattes und steht dem normalen Typus näher, obgleich die starke Entwicklung des Vorhofes schon darauf hindeutet, daß die Spaltöffnung sich in der Richtung des neuen Typus verändern wird, wie man dieses in den Abbildungen Fig. 59, 60, 61 und 62 (Taf. VI) verfolgen kann.

Bei der Spaltöffnung Fig. 62 ist der neue Typus schon stark ausgeprägt, obgleich sie einem jungen Blatt angehört. Wenn wir also die Spaltöffnungen auf jungen Blättern von *Rodgersia tabularis* betrachten, finden wir eine ganze Reihe verschiedener Übergangstypen, von denen ein jeder eine gewisse Analogie bildet zu dem,

<sup>1)</sup> I. Borodin. Zur Anatomie der Blätter von *Chrysosplenium* (russisch). Arbeiten der Naturforsch.-Ges. zu St-Petersburg. Bd. XIV. 1883.



was wir bei verschiedenen Vertretern der Familie der *Saxifragaceae* gesehen haben, wo wir eine ganze Reihe verschiedener Übergangsformen vom normalen zum neuen Typus fanden.

Ähnlich entwickeln sich die Spaltöffnungen auf jungen Blättern von *Brexia madagascariensis*. In Fig. 63 (Taf. VI) sehen wir eine Spaltöffnung vom normalen Typus mit gleich großem vorderem und hinterem Hof und einer Zentralspalte. Es fallen die stark entwickelten Vorsprünge des oberen und des unteren Teils der Spaltöffnung ins Auge. Die Abbildungen 64 und 65 (Tafel VI) zeigen uns, wie sich allmählich der mittlere Spalt erweitert und einen geschlossenen Hohlraum bildet, welcher aus der Verschmelzung beider Höfe entstanden ist. Endlich zeigt Fig. 66 (Taf. VI) eine vollständig ausgebildete Spaltöffnung vom neuen Typus mit den charakteristischen, fest aneinander schließenden unteren Kutikularleisten, welche den Eingang in die Atemhöhle verschließen. Die Spaltöffnung selbst unterscheidet sich nicht mehr von der eines alten Blattes; letzteres hat nur mächtige Kutikularschichten, welche die äußere, verdickte Epidermiswand bilden und zugleich Kutikularverdickungen im oberen Teil der Seitenwände zur Folge haben; das junge Blatt dagegen hat nur schwach verdickte äußere Epidermiswände.

Die biologische Bedeutung des neuen Spaltöffnungstypus bleibt uns unbekannt. In der Tat gehören einige Vertreter der Saxifragaceen, bei denen man solche Spaltöffnungen gefunden hat, zu demselben biologischen Typus, wie zum Beispiel *Rodgersia*, *Astilbe*, *Peltiphyllum*, *Tiarella*, *Heuchera*, *Tolmiea*, *Tellima* und *Mitella* — alles mehrjährige Pflanzen mit breiten, grundständigen Blättern, Bewohner feuchter, schattiger Gegenden der gemäßigten Zone. Das Vorhandensein solcher Spaltöffnungen bei Sträuchern, wie *Ribes* und *Philadelphus*, zeigt uns aber, daß wir es hier mit einem phyletischen Merkmal zu tun haben, d. h. mit einem Anpassungsmerkmal nicht der heutigen Vertreter der Saxifragaceen, sondern ihrer entfernten Vorfahren.

Ogleich nicht alle Vertreter der obengenannten Familie Spaltöffnungen des neuen Typus besitzen, so können wir dennoch in dieser Familie die Tendenz, die Spaltöffnungen in einer Richtung zu verändern, beobachten; wenn wir die allmähliche Entwicklung der Spaltöffnungen bei einem Vertreter, zum Beispiel bei *Rodgersia tabularis*, beobachten, finden wir verschiedene Stadien, welche verschiedenen Typen in der Familie der Saxifragaceen ähneln.



Sehr charakteristisch ist das Vorhandensein ähnlicher Spaltöffnungen der Blätter bei zwei in biologischer Beziehung so weit abstehenden Arten wie *Rodgersia tabularis* und *Brexia madagascariensis*. Erstere Pflanze besitzt breite Blätter mit sehr dünner Blattfläche, sehr dünnen Epidermiswandungen, schwach entwickelter Kutikula, einer Schicht Palissadenzellen, ungewöhnlich stark entwickeltem Schwammgewebe und mächtigen Interzellularräumen. Die untere Hälfte des Blattes hat daher eine sehr lockere Struktur. Die Spaltöffnungen erheben sich über die Oberfläche des Blattes. Bei der tropischen Art *Brexia madagascariensis* ist das Blatt lederartig, ungewöhnlich dick und dicht mit einem stark entwickelten Palissadengewebe, mit kleinen Interzellularräumen im Schwammgewebe, dicken äußeren Epidermiswandungen und ungewöhnlich kräftiger Kutikula. Trotzdem das erstere Blatt einen mehr hydrophilen, das zweite dagegen mehr xerophilen Bau hat, gehören die Spaltöffnungen zu naheverwandten Typen.

In den meisten Fällen steht der neue Typus der Spaltöffnungen im innigen Zusammenhang mit der Erhebung derselben über die Oberfläche des Blattes. Die *Deutzia*-Arten zum Beispiel haben Spaltöffnungen vom neuen Typus und wir finden sie bei *Deutzia corymbosa* in sehr stark ausgeprägter Form. Bei all diesen Arten erheben sich die Spaltöffnungen stark über die Oberfläche des Blattes. Bei *Deutzia gracilis* begegnen wir normalen Spaltöffnungen, bemerken aber zugleich, daß sich diese in kleinen Vertiefungen der Blattoberfläche befinden. *Deutzia parviflora* hat auf ein und demselben Blatt Spaltöffnungen vom neuen Typus, die sich stark über die Oberfläche erheben, daneben auch Spaltöffnungen, die dem normalen Typus sehr nahe stehen und in Vertiefungen liegen.

Beim Genus *Hydrangea* sind die Spaltöffnungen gewöhnlich normal und liegen in gleicher Ebene mit der Epidermis des Blattes. *Hydrangea quercifolia* dagegen hat Spaltöffnungen, die zum neuen Typus gehören und sich über die Oberfläche des Blattes stark erheben. Auch *Hydrangea paniculata* hat Spaltöffnungen, die dem neuen Typus sehr nahe stehen und sich stark erheben. Es sind aber auch Ausnahmen vorhanden, zum Beispiel: *Hydrangea heteromala*, bei der die Spaltöffnungen sich stark erheben, obwohl sie zum normalen Typus gehören. *Philadelphus coronarius* hat neue und erhöhte Spaltöffnungen; die Spaltöffnungen von *Philadelphus microphyllus* sind normal und liegen in gleicher Ebene mit der



Epidermis. Überhaupt liegen die normalen Spaltöffnungen bei den Saxifragaceen gewöhnlich in gleicher Ebene mit der Blattoberfläche. Auch hier gibt es Ausnahmen, z. B. *Decumaria barbara*, bei der sich die Spaltöffnungen des neuen Typus in einer Ebene mit der Blattoberfläche befinden. Dasselbe sehen wir in der Familie der Cunoniaceen (bei *Cunonia capensis* und *Weinmania sylvicola*).

Wir finden also das Vorhandensein des neuen Spaltöffnungstypus nicht immer vereinigt mit der Erhebung der Schließzellen über die Blattoberfläche.

Bei den Vertretern anderer Familien finden wir keinen ähnlichen Typus, obgleich die Spaltöffnungen höher liegen als die Oberfläche des Blattes. Das von mir untersuchte *Rheum Emodi* hat auf

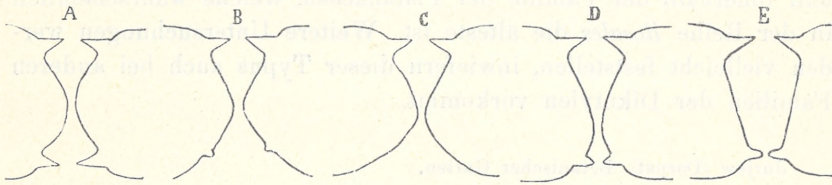


Fig. 2.

der unteren Seite Spaltöffnungen, die sich über die Oberfläche erheben, auf der oberen liegen sie tiefer als die Blattoberfläche, sind aber dennoch in beiden Fällen normal gebaut.

Sehr interessant sind unter den Saxifragaceen z. B. *Heuchera* oder *Peltiphyllum*-Arten. Sie besitzen ähnlich gebaute Spaltöffnungen auf der oberen und der unteren Seite des Blattes. Wenn wir es hier mit einem biologischen Anpassungsmerkmal zu tun hätten, so wäre wohl auf beiden Seiten ein verschiedener Typus zu erwarten.

Die Entstehung des neuen Spaltöffnungstypus kann man sich auf zweierlei Weise erklären: 1) Man kann sich vorstellen, daß die Hinterhofleisten immer kleiner wurden und endlich ganz verschwunden sind. Es blieb also nur der stark verbreiterte, von mächtigen Kutikularleisten überdeckte Vorhof übrig, sowie die von zwei Leisten begrenzte Zentralspalte. Fig. 2 Schema A, B, C. 2) Man kann sich aber auch vorstellen, daß die herabrückende Zentralspalte immer breiter wurde und schließlich ganz verloren ging, so daß sich der Vorhof mit dem Hinterhof zu einem einzigen trichterförmigen Hohlraum vereinigte. Fig. 2 Schema A, D, E.



Diese zweite Entstehungsart der Spaltöffnungen halte ich für wahrscheinlicher. Wir finden nämlich unter den Saxifragaceen einige interessante Übergangstypen, die für diese Auffassung sprechen. So haben z. B. einige *Astilbe*-Arten einen sehr kleinen, kaum bemerkbaren Hinterhof (*Astilbe rivularis*, *japonica*, *grandis*). Derselbe Spaltöffnungstypus mit einem kleinen Hinterhof wiederholt sich bei den *Bergenia*-Arten (*Bergenia crassifolia*, *cordifolia*) auf der oberen und der unteren Fläche des Blattes.

Was nun die Verbreitung des neuen Spaltöffnungstypus anbelangt, so ist bis jetzt nur sicher bekannt, daß er in der Familie der Saxifragaceen häufig vorkommt. Außerdem wurde er beobachtet nur bei den Cunoniaceen, die den Saxifragaceen sehr nahe stehen, und innerhalb der Familie der Platanaceen, welche wahrscheinlich in der Reihe *Rosales* die älteste ist. Weitere Untersuchungen werden vielleicht feststellen, inwiefern dieser Typus auch bei anderen Familien der Dikotylen vorkommt.

Jurjew (Dorpat). Botanischer Garten.

### Erklärung der Tafeln III—VI.

Sämtliche Figuren — mit Ausnahme von Fig. 54 und 55 — stellen Querschnitte von Spaltöffnungen bei derselben Vergrößerung dar. Mikroskop C. Reichert. Obj. 9, Okul. 4.

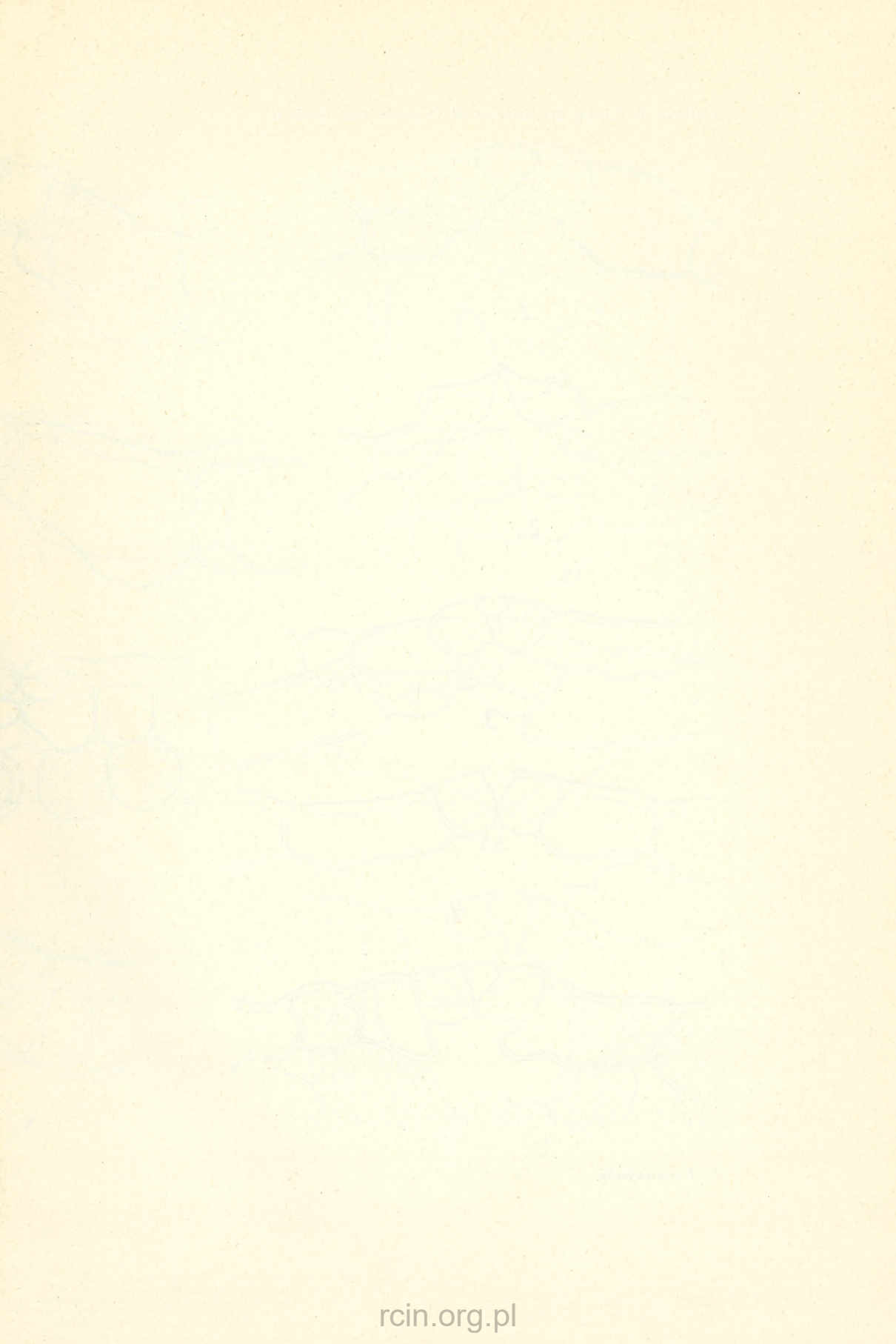
#### Tafel III.

1. *Rodgersia tabularis* (Hemsley) Kom., Blattunterseite.
2. *Petasites officinalis* Moench, Unterseite.
3. *Astilbe rivularis* Hamilt., Unterseite.
4. *Astilbe japonica* (Morr. & Decne) Miq., Unterseite.
5. *Rodgersia podophylla* A. Gray, Unterseite.
6. 7. *Saxifraga pennsylvanica* L. 6: Unterseite, 7: Oberseite.
8. *Saxifraga altissima* Kerner, Oberseite.
9. 10. *Bergenia crassifolia* (L.) Engl. 9: Unterseite, 10: Oberseite.
11. 12. *Peltiphyllum peltatum* (Torr.) Engl. 11: Oberseite, 12: Unterseite.
13. *Heuchera americana* L., Oberseite.

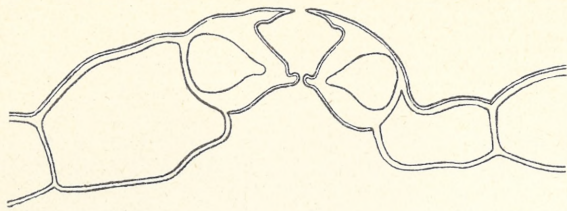
#### Tafel IV.

14. *Tanakaea radicans* Franch. & Savat., Unterseite.
15. *Heuchera americana* L., Unterseite.
16. *Heuchera sanguinea* Engelm., Oberseite.

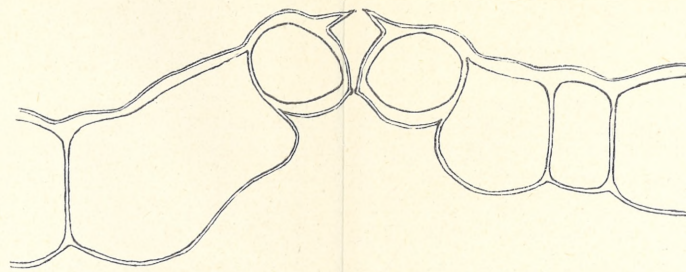




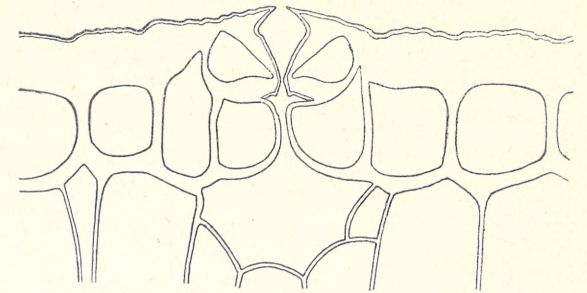




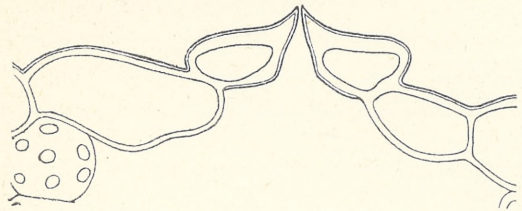
1.



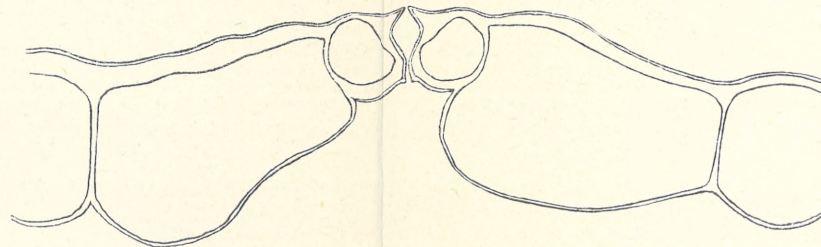
6.



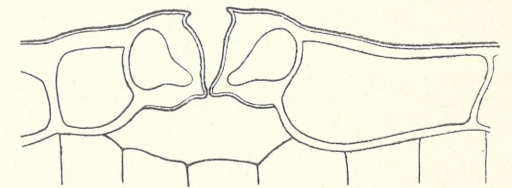
10.



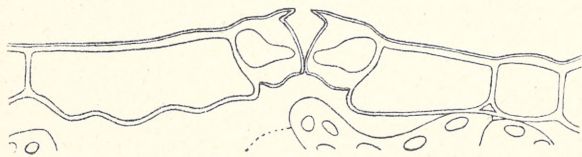
2.



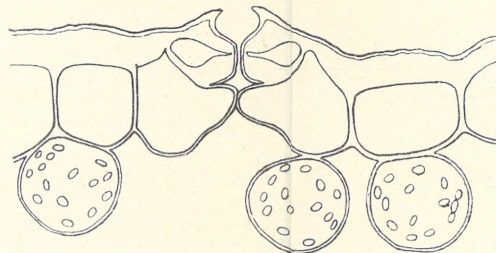
7.



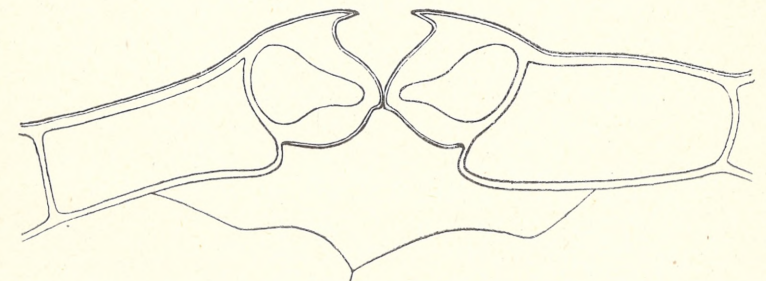
11.



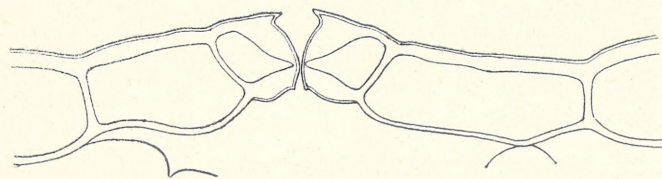
3.



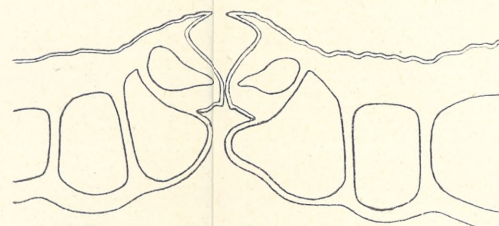
8.



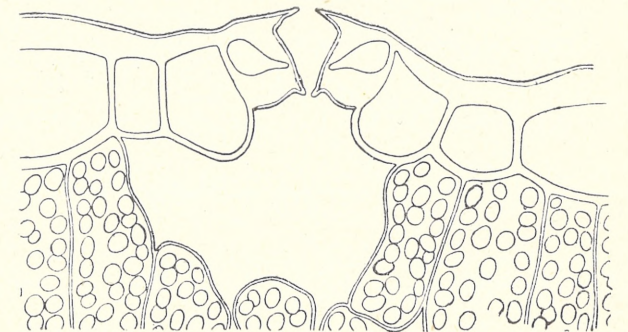
12.



4.



9.



13.

B. Hryniewiecki.



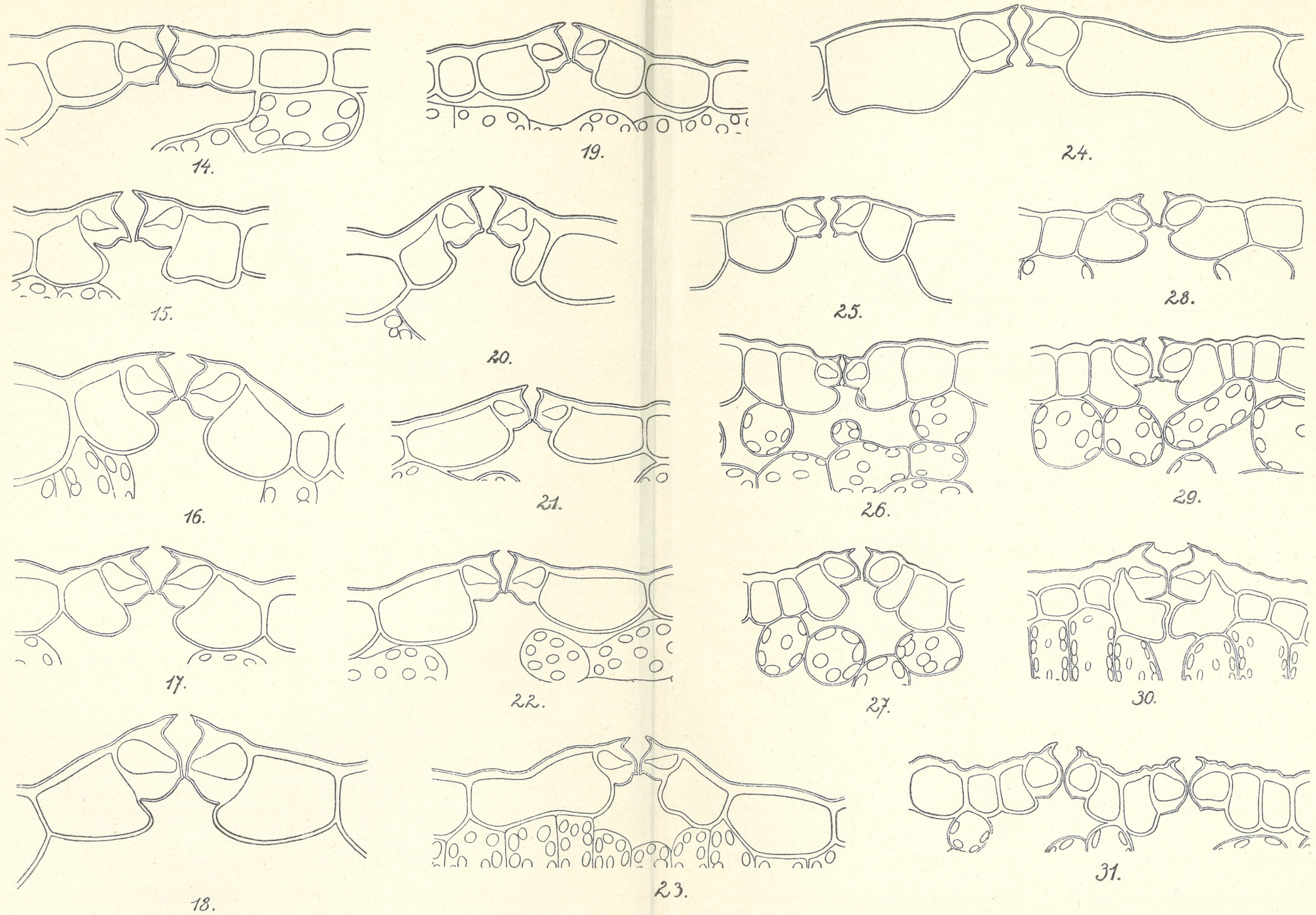






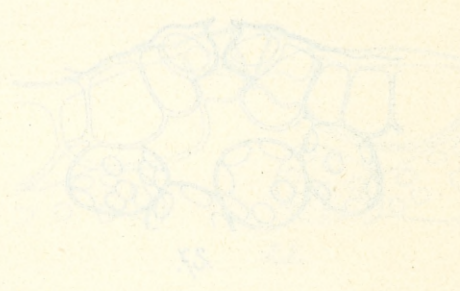
Continúa en la p. 11



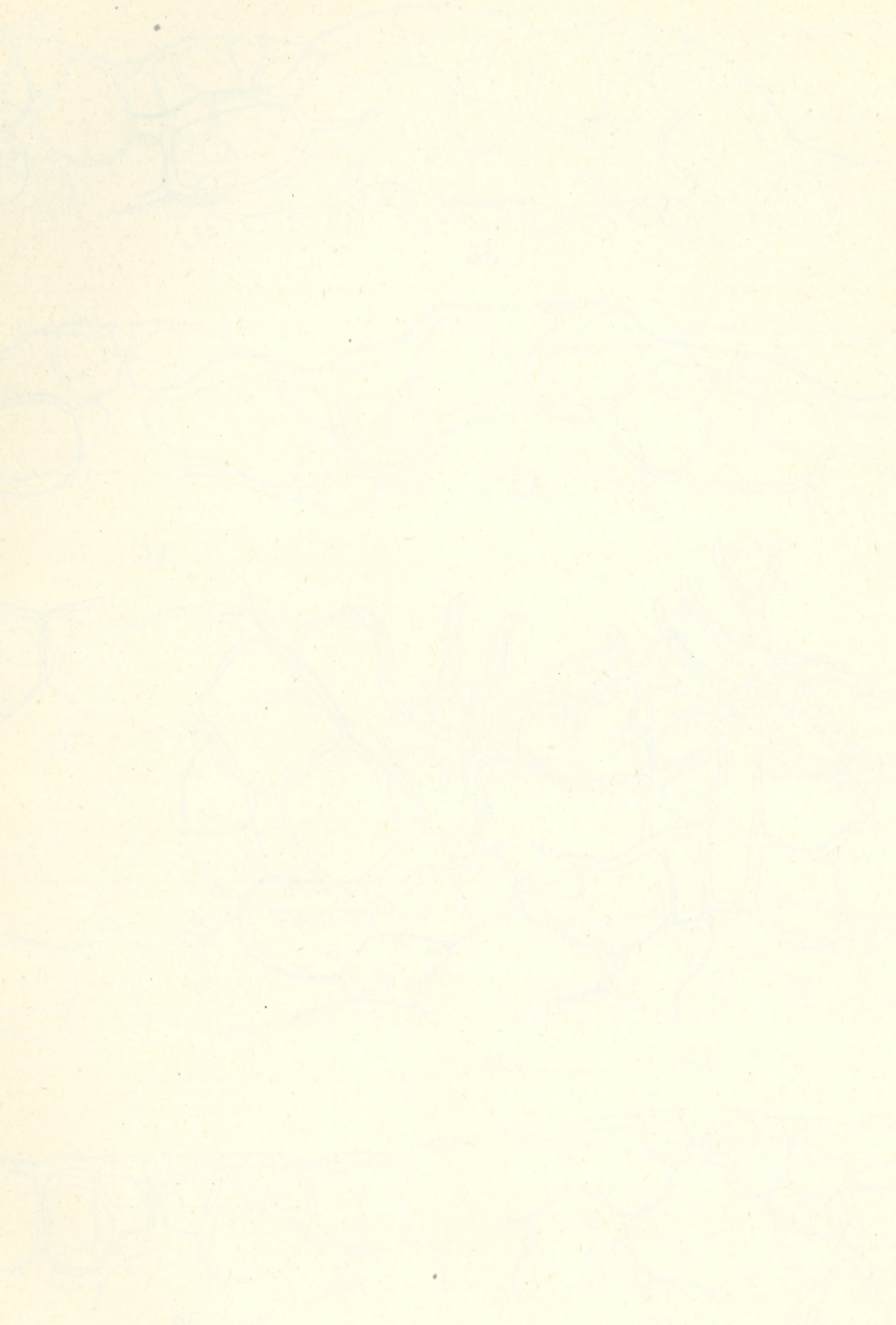


B. Hryniewiecki.



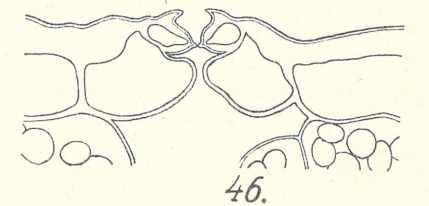
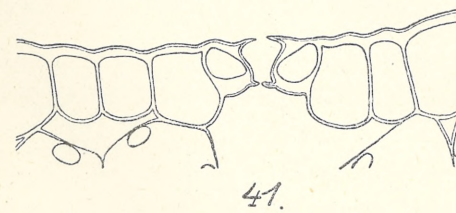
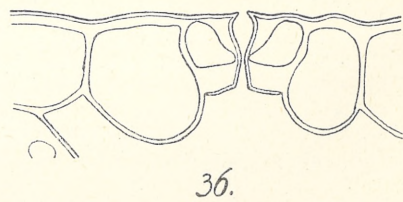
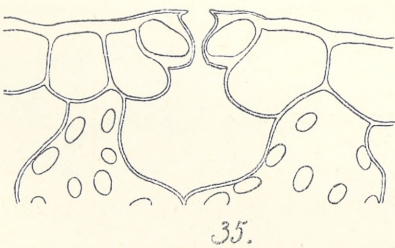
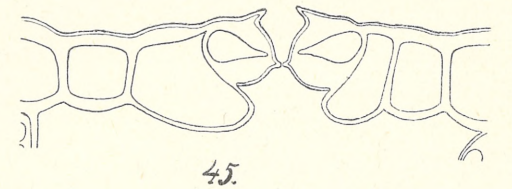
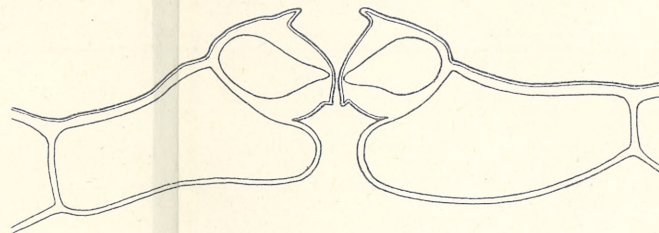
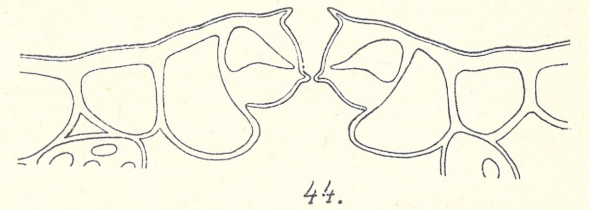
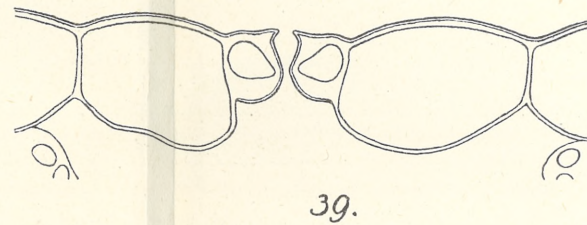
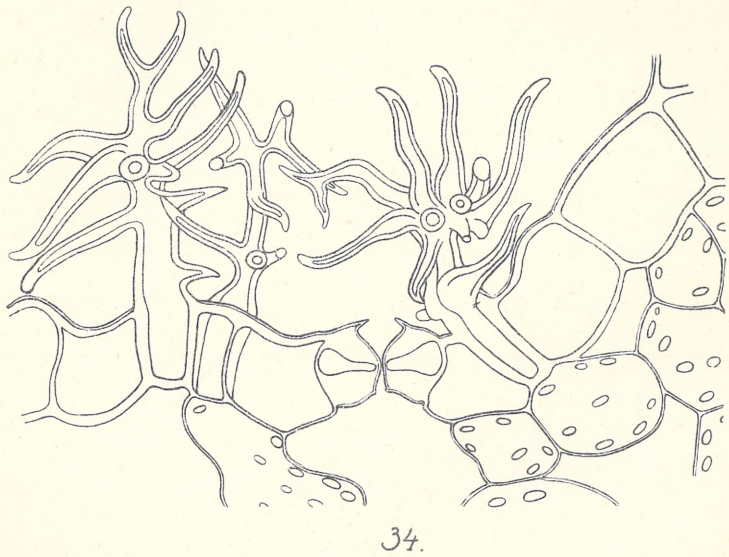
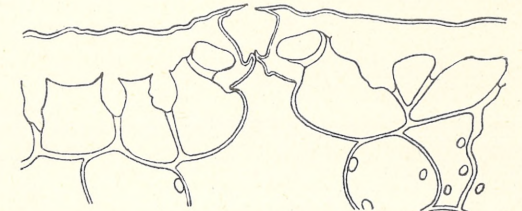
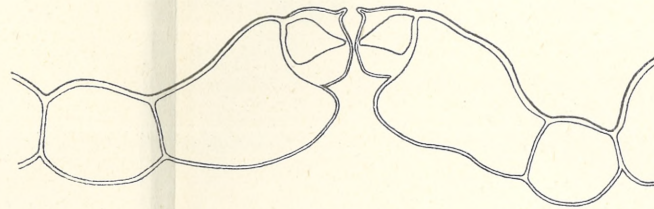
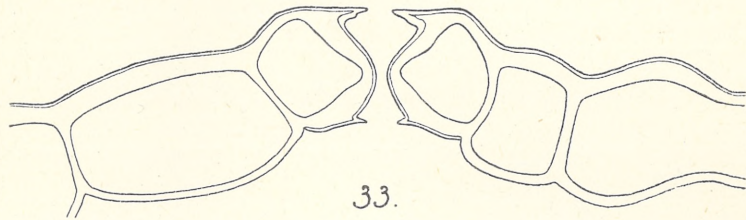
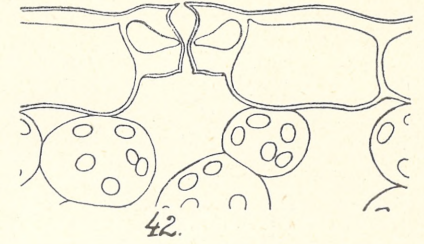
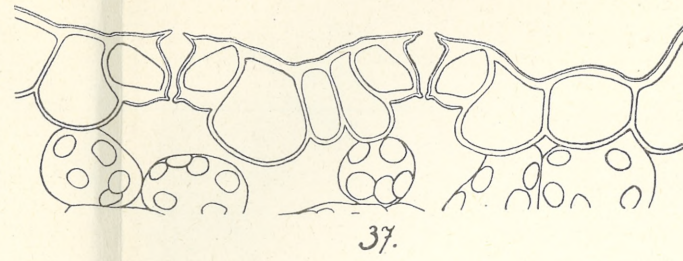
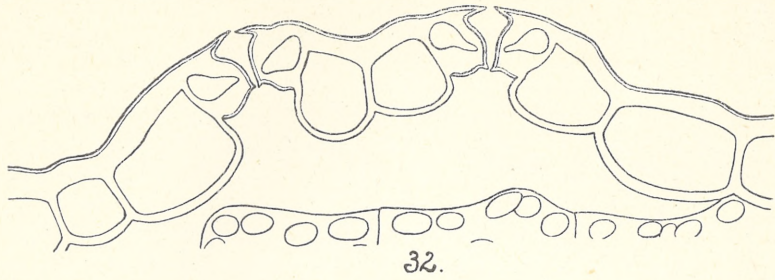






rozwoju



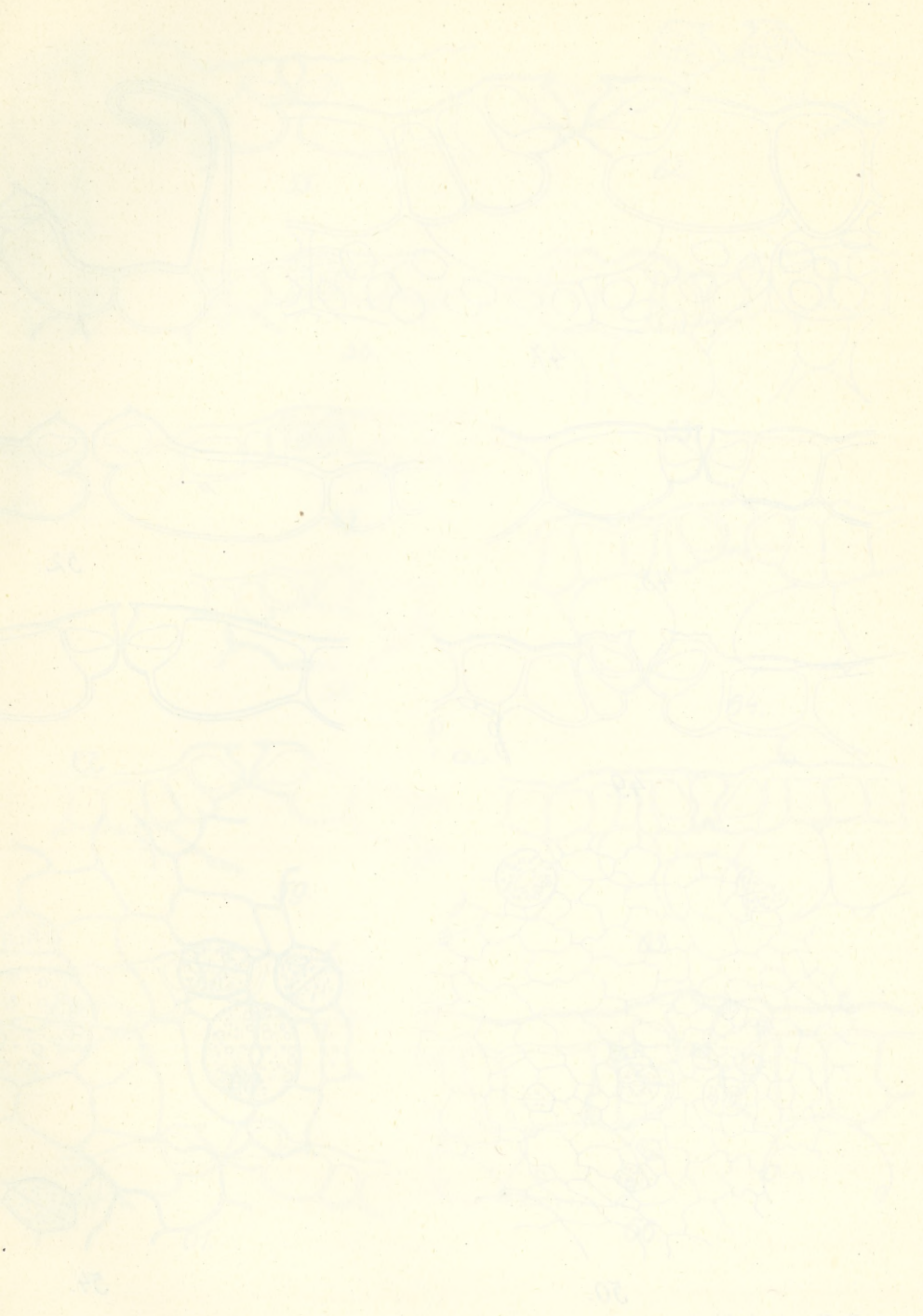


B. Hryniewiecki.

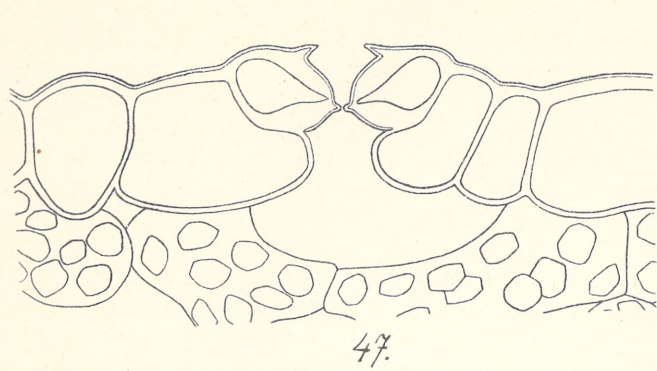




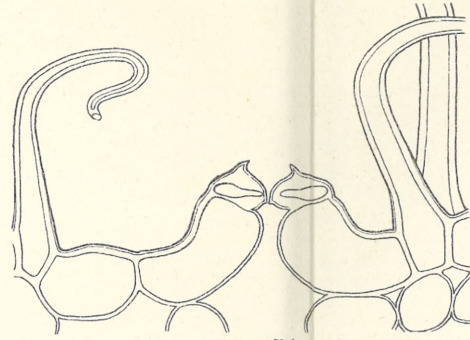




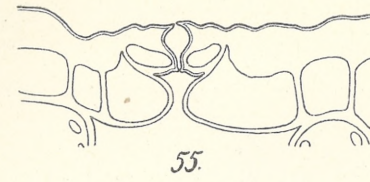




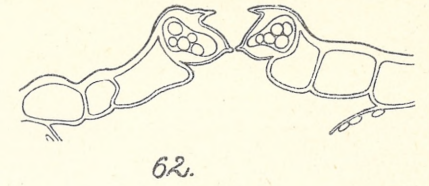
47.



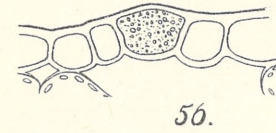
51.



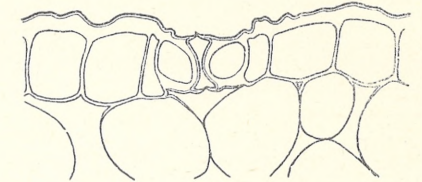
55.



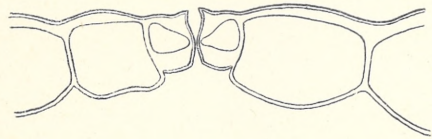
62.



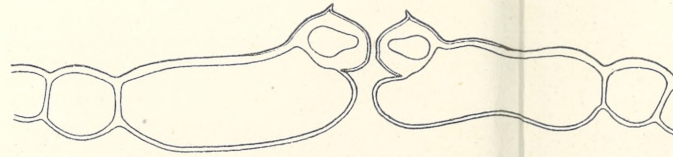
56.



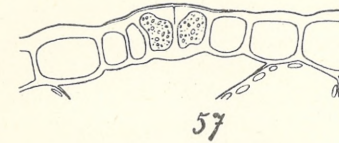
63.



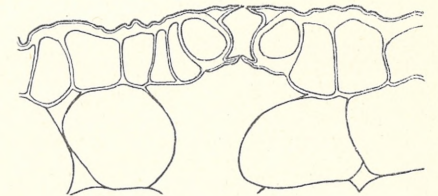
48.



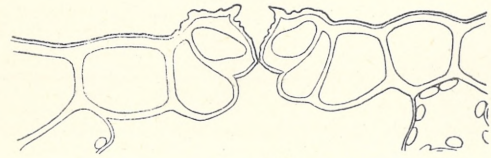
52.



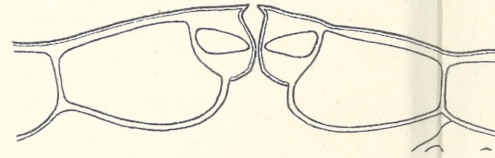
57.



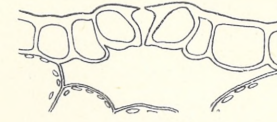
64.



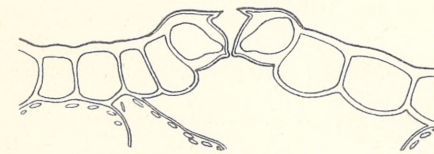
49.



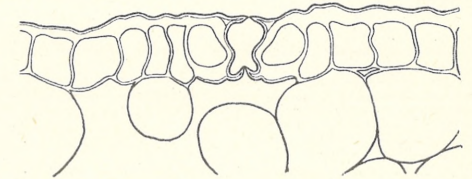
53.



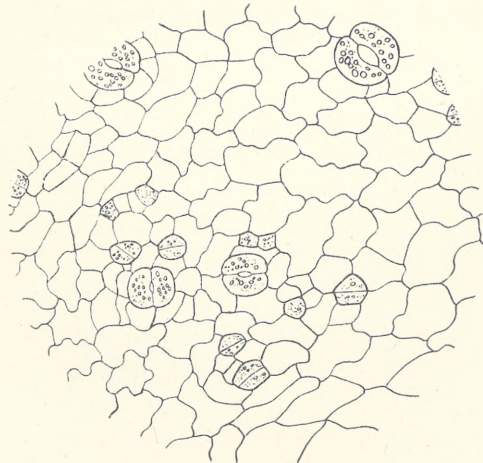
58.



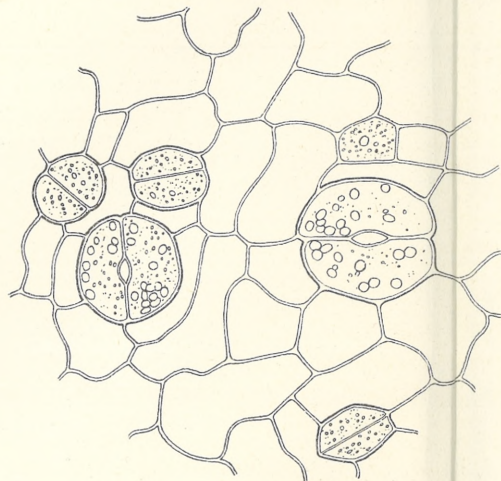
59.



65.



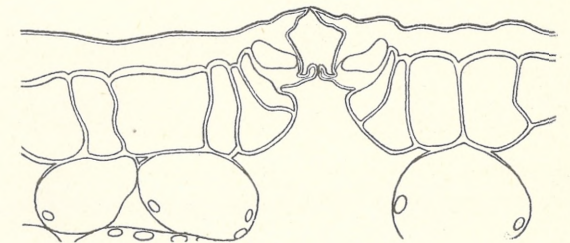
50.



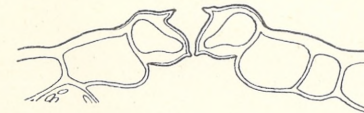
54.



60.



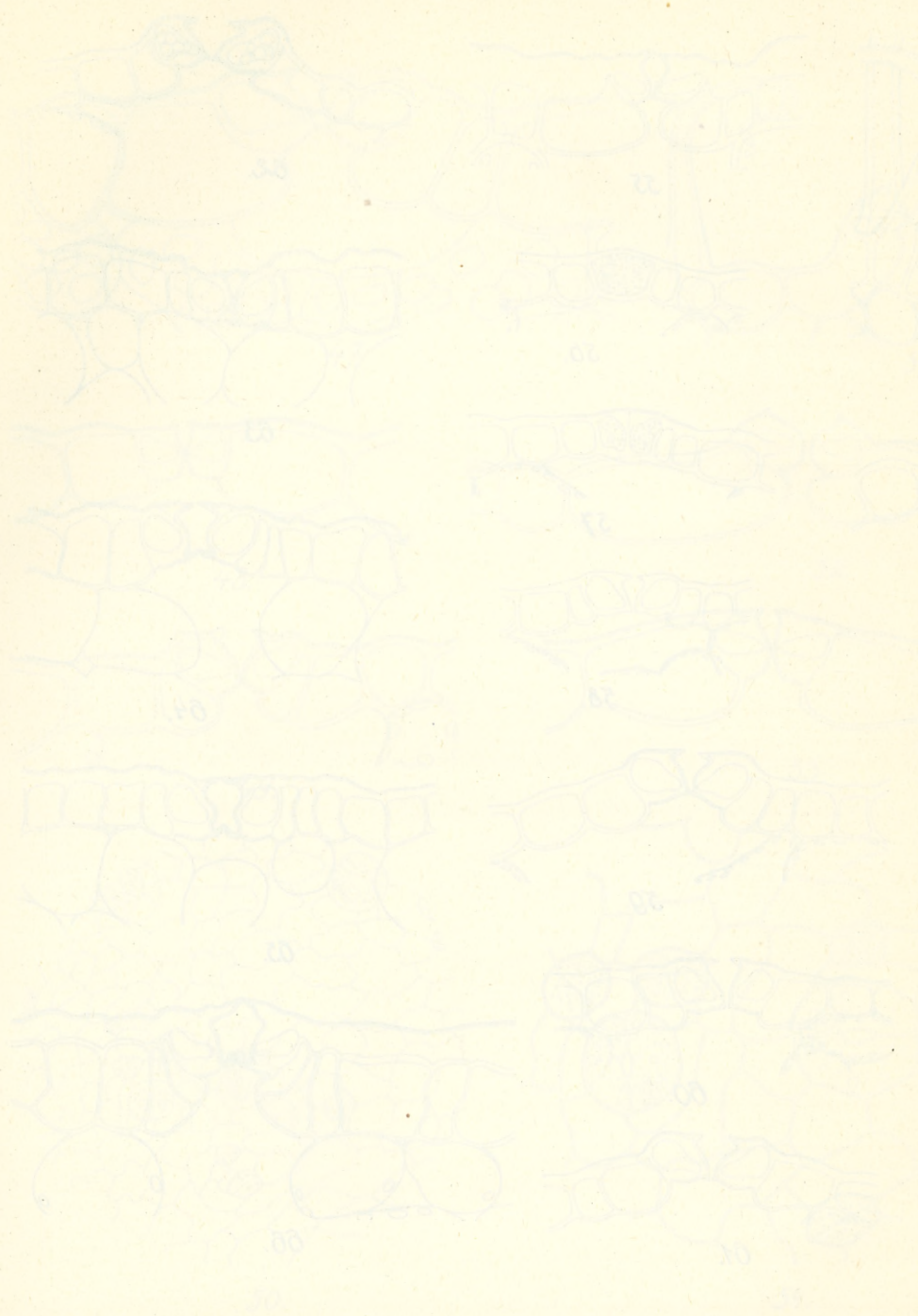
66.



61.

B. Hryniewiecki.







17. *Heuchera villosa* Michx., Unterseite.
18. *Francoa sonchifolia* Cav., Unterseite.
19. *Tiarella cordifolia* L., Unterseite.
20. *Tolmiea Menziesii* (Hook.) Torr. Gray, Unterseite.
21. *Mitella diphylla* L., Unterseite.
22. 23. *Mitella pentandra* Hook., 22: Unterseite, 23: Oberseite.
24. *Chrysosplenium oppositifolium* L., Unterseite.
25. *Chrysosplenium alternifolium* L. Unterseite.
26. *Deutzia gracilis* S. & Z., Unterseite.
27. *Deutzia setchuensis* Franch., Unterseite.
28. 29. *Deutzia corymbosa* R. Br., Unterseite.
30. *Berzelia lanuginosa* (L.) Brongn., Oberseite.
31. *Escallonia viscosa* Forbes, Unterseite.

## Tafel V.

32. *Tellima grandiflora* Pursh, Unterseite.
33. *Parnassia palustris* L., Unterseite.
34. *Fendlera rupicola* Engelm. & Gr., Unterseite.
35. *Schizophragma integrifolia* Oliver, Unterseite.
36. *Hydrangea Hortensia* DC., Unterseite.
37. *Hydrangea quercifolia* Bartram, Unterseite.
38. *Hydrangea heteromala* D. Don., Unterseite.
39. *Hydrangea arborescens* L., Unterseite.
40. *Hydrangea paniculata* Sieb., Unterseite.
41. *Decumaria barbara* L., Unterseite.
42. *Itea virginica* L., Unterseite.
43. *Brexia madagascariensis* Thouars, Unterseite, altes Blatt.
44. *Ribes alpinum* L., Unterseite.
45. *Ribes nigrum* L., Unterseite.
46. *Cunonia capensis* L., Unterseite.

## Tafel VI.

47. *Philadelphus coronarius* L., Unterseite.
48. *Philadelphus microphyllus* Gray, Unterseite.
49. *Platanus orientalis* L., Unterseite.
50. *Rodgersia tabularis* (Hemsley) Kom., Flächenansicht der Epidermis von der Unterseite eines jungen Blattes. Obj. 3, Okul. 2.
51. *Carpenteria californica* Torr., Unterseite.
52. *Jamesia americana* Torr., Unterseite.
53. *Aruncus silvester* L., Unterseite.
54. *Rodgersia tabularis* Hemsley, wie Fig. 50. Obj. 7, Okul. 2.
55. *Weinmania silvicola* Cav., Unterseite.
- 56—62. *Rodgersia tabularis* (Hemsley) Kom., junges Blatt, Unterseite.
- 63—66. *Brexia madagascariensis* Thouars, Unterseite, junges Blatt.



*O wpływie emanacji radu na fagocytozę mikrobów. —  
Action de l'émanation du radium sur la phagocytose des  
microbes.*

Mémoire

de M. **CHARLES KLECKI**,

présenté, par M. M. Siedlecki m. c., dans la séance du 4 Mars 1912.

Inaugurée par les recherches de Danysz, de Bouchard, P. Curie et Balthazard, l'étude de l'action physiologique de l'émanation du radium a démontré d'une façon générale que la cellule animale et microbienne ressent l'action irritante ou nocive de l'émanation du radium et qu'elle est capable d'y réagir. Mais dans la plupart des recherches ultérieures sur ce sujet les efforts des auteurs étant dirigés principalement vers les effets curatifs de l'émanation du radium, l'action qu'exerce cet agent sur la vie cellulaire n'a pas été jusqu'à présent suffisamment étudiée, de sorte que beaucoup de questions relatives à ce sujet sont restées assez obscures.

Vu le rôle important de la phagocytose, surtout dans des conditions pathologiques, et étant donnée la possibilité d'une étude assez approfondie de ce phénomène, je me suis proposé d'étudier l'action de l'émanation du radium sur la phagocytose des microbes.

Je suis le premier qui ait abordé cette question; déjà en 1909 j'ai pu présenter quelques résultats de mes recherches sur ce sujet dans une communication faite au I Congrès de Médecins Polonais réuni à Cracovie.

En 1910 M. Reiter a publié ses recherches expérimentales sur l'action de l'émanation du radium sur la phagocytose du bacille de la tuberculose. Le résultat de ces recherches, dont la méthode diffère beaucoup de celle dont je m'étais servi, est en désaccord parfait avec le résultat de mes recherches analogues. Mes expé-



riences récentes ont confirmé les résultats de mes recherches antérieures et ont permis de les mieux préciser.

Les expériences ont été faites *in vitro*.

Les phagocytes étaient obtenus de la cavité thoracique de lapins préparés par une injection préalable de quelques  $\text{cm}^3$  d'une émulsion d'aleurone en eau physiologique à 3:40. L'eau physiologique servant au lavage des phagocytes était additionnée d'après Hekma de 2 g de citrate de soude par litre. Des émulsions de microbes dans de l'eau physiologique, dont la préparation exige beaucoup de soin, notamment des émulsions du coli-bacille, du staphylocoque pyogène doré et du bacille de la tuberculose humaine, ont été mélangés avec une émulsion de globules blancs bien lavés en eau physiologique; dans un certain nombre d'expériences on additionnait encore ces mélanges de sérum sanguin provenant de l'animal qui avait fourni les phagocytes.

Des gouttelettes de ces mélanges furent suspendues dans l'enfoncement central des lames à préparation microscopiques que l'on plaçait sur une espèce d'échelle, les unes au-dessus des autres, la face des lamelles portant les gouttelettes dirigée en bas, au-dessus du niveau d'eau à l'intérieur de deux vases qui renfermaient chacun 100  $\text{cm}^3$  d'eau distillée. L'intérieur de chacun de ces deux vases hermétiquement fermés par des bouchons en caoutchouc et placés dans une étuve réglée à 37° communiquait avec l'intérieur de deux vases d'Erlenmeyer, dont l'un renfermait 250  $\text{cm}^3$  d'une solution aqueuse de 2 mg de bromure de radium et l'autre la même quantité d'eau distillée. La solution du sel de radium qui servait comme source d'émanation dans ces expériences a été gracieusement mise à ma disposition par M. le professeur Witkowski. Un tube en verre en Y dont les deux branches descendaient dans l'intérieur des vases renfermant les lames porteuses des gouttelettes, était ajusté à une trompe à eau, de sorte qu'il était facile de faire traverser par l'intérieur de ces deux vases en même temps un courant d'air humide; par l'intérieur d'un de ces vases passait un courant d'air chargé d'émanation du radium, par l'autre vase passait un courant d'air pur; les gouttelettes du mélange de phagocytes et de microbes placées dans ce second vase servaient pour les préparations de contrôle que l'on avait soin de faire dans chaque expérience.

Le diamètre des tubes en verre et en caoutchouc par lesquels



communiquaient les différentes parties de l'appareil était le même dans toutes les pièces analogues des deux moitiés de celui-ci. Les tubes en caoutchouc étaient munis de serres, de sorte qu'on pouvait isoler l'atmosphère de l'intérieur de chaque partie de l'appareil. Après avoir ouvert toutes ces serres et mis en action la trompe à eau, on faisait passer par l'intérieur des deux vases renfermant les gouttelettes du mélange de phagocytes et de microbes, un courant d'air dont l'intensité, réglée d'après la quantité des bulles de gaz qui traversaient dans ces vases la couche d'eau distillée pour éclater à sa surface et se mélanger avec l'atmosphère de l'intérieur des vases, était la même, dont l'humidité et la température étaient aussi les mêmes et qui ne différait que par l'émanation du radium dont était chargé le courant d'air qui passait par une moitié de l'appareil. L'émanation apportée par le courant d'air à la couche d'eau renfermée dans un des deux vases en cause, s'y dissolvait pour une part. pour en être éliminée plus tard, et pour une autre part elle traversait avec les bulles d'air cette couche fluide et, en se mélangeant avec le milieu gazeux renfermé dans le vase, elle trouvait sur son chemin le fond des gouttelettes où les phagocytes dévoraient les microbes.

La couche fluide qui séparait les cellules du milieu gazeux ambiant était donc très mince, de sorte que les phagocytes et les microbes étaient dans ces conditions très bien exposés à l'action de l'émanation du radium.

Il était important de savoir quelle était dans ces expériences la concentration de l'émanation du radium dans l'air entourant les gouttelettes dans lesquelles se faisait la phagocytose des microbes; de même, il était important d'arranger les expériences d'une telle façon que dans toutes les expériences analogues la concentration de l'émanation soit à peu près la même. Comme il n'était pas possible dans ces expériences pour des raisons de technique de doser l'émanation directement dans l'air renfermé dans le vase où étaient placées les gouttelettes, il fallait se borner au dosage de l'émanation du radium dans l'eau que renfermait ce vase et dans laquelle s'accumulait l'émanation au passage des bulles de gaz qui en était chargé. Des dosages répétés, faits avec le phontactoscope d'Engler et Sieveking, ont démontré qu'après un passage par cette eau d'air chargé d'émanation durant 1 heure, un quart d'heure et même 10 minutes, avec une vitesse de 60—100 bulles de gaz par minute,



cette eau contenait environ 1,000.000 unités d'émanation<sup>1)</sup> par litre, et cela même dans le cas lorsqu'on puisait l'émanation toujours de la même source une fois par jour, plusieurs jours de suite. L'eau d'où s'échappait l'émanation du radium pour exercer son action sur le phénomène de la phagocytose qui se produisait dans les gouttelettes, était donc assez riche en émanation; sa concentration était ici à peu près la même que celle qui est réalisée dans l'eau fournie par les émanateurs qui servent pour des cures internes avec de l'eau radioactive.

Comme il suffisait de faire passer le courant d'air chargé d'émanation par l'eau en question pendant 10 minutes pour que l'émanation s'y accumule dans une quantité d'environ 1,000.000 unités par litre, on faisait passer par l'eau dans toutes les expériences l'air chargé d'émanation pendant 10 ou 15 minutes; puis on serrait les tubes en caoutchouc pour isoler de l'entourage l'atmosphère de l'intérieur des vases où se faisait la phagocytose et on laissait ces vases à l'étuve encore pendant 30 ou 45 minutes, un espace de temps qui suffit parfaitement pour que le phénomène de phagocytose puisse se produire d'une façon prononcée.

Lorsque ceci était accompli, on faisait des préparations microscopiques des gouttelettes placées dans les deux vases, le plus souvent 10 préparations pour chaque mélange. Les préparations du liquide renfermant le coli-bacille ou le staphylocoque étaient colorées par le bleu de méthylène ou par le violet de gentiane, celui renfermant le bacille de la tuberculose par la fuchsine phéniquée et le bleu de méthylène. L'examen de toutes les préparations provenant d'une expérience, bien entendu, les préparations de contrôle y compris, se faisait de suite le jour même de l'expérience ou le lendemain.

On sait qu'il n'est pas toujours facile de déterminer d'une façon précise l'intensité de la phagocytose de microbes dans un milieu quelconque. Pour déterminer l'index phagocytaire Wright a proposé de déterminer le nombre des microbes dévorés par une vingtaine de phagocytes. Sauerbeck a démontré l'insuffisance de ce procédé qui conduit à des erreurs considérables, de même quand l'intensité de la phagocytose est grande que quand elle est faible;

<sup>1)</sup> La quantité des unités d'émanation correspond à la quantité des Volts de chute de potentiel par heure.



l'inégalité de l'avidité avec laquelle les phagocytes dévorent presque toujours les microbes en est la cause principale. C'est pourquoi Sauerbeck exige que l'on détermine dans chaque préparation le nombre des microbes dévorés par 100 phagocytes, surtout lorsque l'inégalité de la phagocytose dans la préparation examinée est prononcée ou lorsque les phagocytes n'étant pas répartis dans la préparation d'une façon assez uniforme se sont accumulés en petits amas.

Dans les expériences présentes on déterminait le nombre de microbes dévorés par 80—300 phagocytes dans chaque liquide examiné; le plus souvent j'étudiais 200—240 phagocytes dont j'examinais 20 dans chacune des 10 préparations. Pour cet examen, on choisissait les parties des préparations dans lesquelles les phagocytes étaient répartis dans leur milieu d'une façon uniforme et entourés de microbes libres. Tous les globules blancs qui ne paraissaient pas se trouver à l'état tout à fait normal étaient éliminés de cet examen. Dans les expériences avec le coli-bacille et le staphylocoque doré, les microphages neutrophiles seulement furent examinés, dans les expériences avec le bacille de la tuberculose on déterminait le nombre des microbes dévorés par les microphages et par les macrophages.

On a remarqué plus haut que, dans une partie de ces expériences, on additionnait le mélange de phagocytes et de microbes de sérum sanguin provenant de l'animal qui avait fourni les phagocytes. D'après Wright et Douglas, les opsonines jouent dans le phénomène de la phagocytose des microbes un rôle tellement important que sans leur action le phénomène ne peut pas se produire. Sauerbeck confirme cette opinion pour la phagocytose du streptocoque, tandis que, d'après Sawtchenko, Barykin et Maikow, les opsonines ne sont pas indispensables pour la phagocytose de microbes et de grains de charbon ou de carmin par les globules d'animaux à sang chaud dans un milieu isotonique avec les humeurs de ces animaux.

Mes expériences démontrent que les phagocytes du lapin peuvent dévorer le coli-bacille, le staphylocoque doré, le bacille de la tuberculose humaine et des grains de carmin dans un milieu qui ne contient pas d'opsonines. Il est vrai que l'intensité de la phagocytose n'est pas grande généralement dans ces conditions et qu'elle augmentait dans les expériences où l'on ajoutait, au milieu dans lequel les phagocytes dévoraient les microbes, du sérum sanguin en



quantité correspondante à celle de l'émulsion des phagocytes en eau physiologique. Mais, même dans les cas où les opsonines faisaient défaut, l'intensité de la phagocytose était suffisamment grande pour que l'influence de l'émanation du radium sur ce phénomène puisse se manifester.

Dans les recherches présentes j'ai exécuté 28 expériences. Dans 22 parmi ces expériences on a examiné la phagocytose de microbes dans un milieu renfermant l'émanation du radium. Dix expériences ont été faites avec le coli-bacille; dans toutes les expériences la phagocytose des bacilles se faisait dans un milieu qui ne contenait pas de sérum et dans deux expériences elle se faisait en plus dans un milieu additionné de sérum. Deux expériences ont été faites avec le staphylocoque pyogène doré; la phagocytose de ce microbe se faisait dans un milieu ne renfermant pas de sérum. Enfin dix expériences ont été faites avec le bacille de la tuberculose humaine; la phagocytose de ce bacille se faisait dans toutes ces expériences dans un milieu qui ne renfermait pas de sérum et dans six expériences elle se faisait en plus dans un milieu additionné de sérum.

Comme l'intensité de la phagocytose dans ces expériences était en général plutôt faible et comme les phagocytes ne dévoraient pas les microbes d'une façon uniforme, il était nécessaire d'examiner dans chaque expérience un nombre considérable de phagocytes.

Dans les deux tableaux qui suivent on trouvera les résultats des 22 expériences dans lesquelles la phagocytose des microbes se faisait dans une atmosphère renfermant l'émanation du radium. On voit dans ces tableaux le nombre des phagocytes examinés dans chaque expérience, le nombre des microbes qu'ils avaient dévorés, le nombre des microbes dévorés calculé pour 100 phagocytes et l'index phagocytaire qui détermine les variations de l'intensité de la phagocytose sous l'influence de l'émanation du radium comparée à celle dans l'expérience analogue de contrôle.

Dans les deux dernières expériences avec le coli-bacille et les six dernières expériences avec le bacille de la tuberculose on voit sous a) les nombres obtenus dans le cas quand la phagocytose se faisait dans un milieu qui ne renfermait pas de sérum et sous b) les nombres analogues pour le cas quand le milieu liquide de la phagocytose des microbes était additionné de sérum sanguin.



## Expériences avec le coli-bacille et le staphylocoque pyogène doré.

Microbe examiné	Expérience	Action de l'émission du radium		Contrôle		Microbes dévorés par 100 phagoc.		Index phagocytaire
		Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Action de l'émission du radium	Contrôle	
C o l i - b a c i l l e	I	200	170	200	149	85	75	1·13
	II	160	143	160	106	89	77	1·16
	III	200	346	200	277	173	139	1·25
	IV	180	298	200	223	167	112	1·40
	V	180	145	200	130	81	65	1·24
	VI	100	55	100	50	55	50	1·10
	VII	300	227	280	146	76	52	1·47
	VIII	240	154	120	45	56	38	1·46
	IX a)	240	414	240	190	172	79	2·18
	b)	240	511	200	141	213	71	3·00
X	a)	240	376	240	258	157	108	1·45
	b)	240	469	200	86	183	43	4·26
Staph. pyog. doré	XI	160	89	120	59	56	49	1·14
	XII	180	401	200	313	223	157	1·42

On voit donc que dans toutes les expériences avec le coli-bacille et le staphylocoque doré l'émission du radium renforçait la phagocytose des microbes, surtout dans les expériences avec le coli-bacille dans lesquelles le milieu de l'activité des cellules renfermait du sérum sanguin.

Dans 10 expériences avec le coli-bacille, dans lesquelles la phagocytose des microbes se faisait sous l'influence de l'émission du radium dans un milieu qui ne renfermait pas du sérum sanguin, l'index phagocytaire était de 1·10—2·18, en moyenne 1·38 et dans 2 expériences où la phagocytose se faisait dans un milieu additionné de sérum, il était de 3·00 et 4·26, en moyenne 3·63. Dans 2 expériences avec le staphylocoque l'index phagocytaire était dans les mêmes conditions 1·14 et 1·42, en moyenne 1·28.

Le résultat des expériences faites avec le bacille de la tuberculose n'était pas d'une constance aussi absolue que celui des ex-



Expériences avec le bacille de la tuberculose humaine.

Expérience	Action de l'ém. du radium		Contrôle		Microbes dévorés par 100 phagocytes		Index phagocyttaire
	Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Action de l'ém. du radium	Contrôle	
XIII	200	174	200	267	87	133	0.65
XIV	200	293	200	346	156	173	0.90
XV	200	148	200	191	74	95	0.78
XVI	200	187	200	277	94	138	0.68
XVII b)	180	327	180	321	182	178	1.02
XVIII a)	200	133	160	162	67	100	0.67
	b)	240	257	240	396	107	165
XIX a)	200	178	160	186	89	116	0.77
	b)	200	343	120	185	171	155
XX a)	240	453	240	722	189	301	0.63
	b)	240	705	240	744	294	310
XXI a)	120	88	200	203	73	100	0.73
	b)	240	260	80	174	108	217
XXII a)	120	79	240	154	66	64	1.03
	b)	240	201	280	340	84	121

périences précédentes. Les index phagocytaires suivants ont été trouvés dans 3 expériences: 1.02, 1.10 et 1.03 pour le cas quand la phagocytose du bacille se faisait sous l'influence de l'émanation du radium. A mon avis, cette augmentation de l'index phagocyttaire, si légère qu'elle rentre sans aucun doute dans les limites des erreurs si faciles à commettre dans ce genre de recherches, n'autorise à aucune conclusion. Dans toutes les autres expériences avec le bacille de la tuberculose, l'émanation du radium diminuait l'intensité de la phagocytose. Dans 8 expériences sans sérum sanguin l'index phagocyttaire était de 0.63 à 0.90, en moyenne 0.74 et dans 4 expériences avec sérum il était de 0.50 à 0.95, en moyenne 0.70.

Excepté 2 expériences avec le coli-bacille où l'émanation du radium avait augmenté d'une façon considérable l'intensité de la phagocytose du microbe dans un milieu additionné de sérum, les variations de l'intensité de la phagocytose des microbes sous l'influence de cet agent n'étaient pas généralement considérables dans



les conditions de ces expériences. Pour la phagocytose du coli-bacille et du staphylocoque se produisait une augmentation et pour la phagocytose du bacille de la tuberculose une diminution d'intensité d'environ 30% en moyenne pour les deux cas.

La constance avec laquelle l'émanation du radium augmentait dans ces expériences l'intensité de la phagocytose du coli-bacille et du staphylocoque et la grande fréquence avec laquelle elle diminuait celle du bacille de la tuberculose plaident en faveur de l'opinion d'après laquelle le résultat de ces expériences ne serait pas accidentel et ne dépendrait pas des erreurs qu'on aurait commises en déterminant le nombre des microbes dévorés par les phagocytes.

Après avoir constaté l'augmentation de l'intensité de la phagocytose du coli-bacille et du staphylocoque sous l'influence de l'émanation du radium, j'ai cherché à établir lequel des éléments intéressés dans ce phénomène est influencé par l'émanation. Cette question a été étudiée dans 4 nouvelles expériences, faites avec le coli-bacille comme les expériences précédentes et en se servant du même appareil qui a été décrit plus haut; dans ces expériences on faisait agir l'émanation du radium séparément sur une émulsion de phagocytes et sur une émulsion de microbes dans de l'eau physiologique qui dans tous les cas était additionnée de sérum sanguin provenant de l'animal qui avait fourni les phagocytes pour l'expérience. L'action de l'émanation sur l'élément choisi étant terminée, on y mélangeait l'autre élément, phagocytes ou microbes, qui n'avait pas subi l'action de l'émanation du radium. Le liquide dans lequel se faisait dans ces expériences la phagocytose des microbes était un mélange de 6 gouttes d'émulsion de phagocytes, de 6 gouttes de sérum sanguin et de 3 gouttes d'émulsion du coli-bacille en eau physiologique. Il est évident que dans chaque expérience on faisait, comme dans les précédentes, des expériences de contrôle.

On trouvera les résultats de ces expériences dans le tableau qui suit. Dans chaque expérience on voit sous a) les nombres obtenus pour le cas lorsque les phagocytes furent soumis à l'action de l'émanation du radium et sous b) lorsque les microbes y étaient exposés.

Dans toutes ces expériences, l'émanation du radium ayant agi soit sur les phagocytes soit sur les microbes, augmentait l'intensité de la phagocytose, parfois même d'une façon très prononcée. Dans 3 expériences la phagocytose était beaucoup plus intense quand



Expériences avec le coli-bacille.

Expérience	Action de l'ém. du radium		Contrôle		Microbes dévorés par 100 phagocytes		Index phagocytaire
	Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Phagocytes examinés	Microbes dévorés	Action de l'ém. du radium	Contrôle	
XXIII a)	240	771	240	144	354	60	5.90
XXIII b)	240	239	240	167	100	70	1.43
XXIV a)	240	249	240	106	100	44	2.27
XXIV b)	240	119	240	88	49	37	1.32
XXV a)	240	250	160	49	100	21	4.76
XXV b)	240	122	240	62	51	26	1.96
XXVI a)	240	110	240	78	46	33	1.39
XXVI b)	240	96	240	64	40	27	1.48

L'émanation avait agi sur les phagocytes que dans le cas lorsqu'elle avait agi sur les microbes et dans une expérience le renforcement de la phagocytose était dans les deux cas à peu près le même. Dans les expériences dans lesquelles l'émanation avait agi sur les phagocytes, l'index phagocytaire était en moyenne 3.83 et dans les expériences où elle avait agi sur les microbes il était en moyenne 1.55. Il est donc permis de conclure de ces expériences que l'augmentation de l'intensité de la phagocytose du coli-bacille sous l'influence de l'émanation du radium est due principalement à l'action de l'émanation sur les phagocytes et en second lieu à celle qu'elle exerce sur les microbes.

Il ressort aussi de deux expériences que j'ai faites avec des grains de carmin que l'émanation du radium exalte l'avidité des phagocytes. Dans ces expériences, les grains de carmin ont été parfois dévorés par les phagocytes dans une quantité très considérable, de sorte qu'il n'était pas possible de déterminer d'une façon précise leur nombre dans le plasma des globules. Il a donc fallu déterminer en bloc dans ces expériences le nombre des phagocytes qui avaient dévoré des grains de carmin, sans compter le nombre de ces grains, et le comparer au nombre des phagocytes qui sous ce rapport étaient restés inactifs. Il est évident que cette méthode est moins précise que celle dont on s'était servi dans



les expériences faites avec les microbes; elle n'a été appliquée que faute de mieux. L'index phagocytaire quand l'émanation du radium avait agi sur les phagocytes a été trouvé dans ces 2 expériences égal à 1.18 et 1.13. Le résultat de ces 2 expériences, dont la méthode laisse à désirer, n'a qu'une valeur relative, mais il confirme le résultat des expériences faites avec le coli-bacille, notamment que l'augmentation de l'intensité de la phagocytose par l'émanation du radium est due en partie à l'action excitante qu'elle exerce sur les phagocytes.

On a remarqué plus haut que le résultat obtenu dans les expériences avec le bacille de la tuberculose est en désaccord avec celui auquel est parvenu M. Reiter. Il est vrai que cet auteur admet que parfois l'émanation du radium semble protéger les bacilles de la tuberculose contre la voracité des phagocytes, mais en général la phagocytose de ce bacille d'après M. Reiter est renforcée par l'émanation du radium, quelquefois jusqu'à 30%. Le degré de l'augmentation de l'intensité de la phagocytose du bacille de la tuberculose était donc, dans les expériences de M. Reiter, à peu près le même que celui de son affaiblissement dans mes expériences analogues.

Il est difficile d'indiquer d'une façon précise les causes qui ont contribué à provoquer ce désaccord; les méthodes expérimentales dont s'était servi M. Reiter dans ses recherches en sont, à mon avis, la cause principale.

Il ressort des expériences que j'ai faites avec le coli-bacille que l'émanation du radium, en exerçant une action excitante sur les phagocytes, influence en même temps les microbes. Le fait établi dans les recherches présentes que l'émanation du radium en agissant dans des conditions identiques favorise la phagocytose d'une certaine espèce microbienne et affaiblit la phagocytose d'une autre, parle de même en faveur de l'opinion d'après laquelle l'émanation exercerait une action non seulement sur les globules blancs, mais aussi sur les microbes; cette action concernant la facilité avec laquelle les microbes sont dévorés par les phagocytes, peut être différente sur différentes espèces microbiennes. Ce résultat des recherches présentes est en accord avec les faits constatés par les auteurs qui ont étudié l'action bactéricide de l'émanation du radium. Il a été démontré que ce facteur exerce une action bactéricide sur la plupart des microbes examinés, saprophytes et microbes pathogènes;



d'après les recherches de Suess, le bacille de la tuberculose, par contre, n'est pas sensible à cette action de l'émanation. De même, les faits constatés dans cette étude sont aussi confirmés par le résultat des essais, peu nombreux du reste, d'un traitement local de différentes infections par l'émanation du radium, notamment par les essais de Bartels, de Bulling et de Suess.

La phagocytose des microbes étant un phénomène très compliqué, influencé par toute une série de facteurs qui exercent leur action sur les globules et les microbes, plusieurs hypothèses se présentent pour mieux préciser le mécanisme des variations qu'on voit se produire dans la phagocytose des microbes sous l'influence de l'émanation du radium. Mais comme l'action de l'émanation sur divers facteurs qui influencent la phagocytose n'est pas encore suffisamment étudiée, la valeur de ces hypothèses n'est pas grande. Ce n'est qu'après une étude de l'action de l'émanation du radium sur les anticorps microbiens, étude déjà inaugurée par les recherches de Schütze, que l'on pourra mieux élucider le mécanisme qui ici est en cause. Pour le moment, nous nous bornons à constater les faits suivants:

1. L'émanation du radium qui échappe d'une eau qui la renferme dans une quantité d'environ 1,000.000 unités par litre, exerce une action sur la phagocytose des microbes.

2. Cette action est différente selon l'espèce des microbes dévorés: elle renforce la phagocytose du coli-bacille et du staphylocoque pyogène doré et elle affaiblit la phagocytose du bacille de la tuberculose humaine.

3. L'émanation du radium exerce une action sur les deux éléments intéressés dans le phénomène de la phagocytose: globules et microbes.

4. L'action qu'exerce l'émanation du radium sur différentes espèces microbiennes peut être différente; son action sur le coli-bacille et le staphylocoque pyogène doré est différente de celle qu'elle exerce sur le bacille de la tuberculose humaine.

5. Le renforcement de la phagocytose du coli-bacille par l'émanation du radium est due principalement à l'action excitante qu'elle exerce sur les phagocytes, et en second lieu à l'action de l'émanation sur les microbes.

Ces recherches ont été exécutées à l'Institut de Pathologie générale et expérimentale de l'Université de Cracovie.



## Bibliographie.

- Bouchard, P. Curie et Balthazard. Action physiologique de l'émanation du radium. C. R. de l'Acad. des Sc. 1904.
- Danysz. De l'action pathogène des rayons et des émanations émises par le radium sur différents tissus et différents organismes. C. R. de l'Acad. d. Sc. 1903.
- Hekma. Ein Beitrag zur Verwendung von zitronensaurem Natron im Dienste von Untersuchungen über Phagocytose. Biochem. Ztschr. 1908.
- Klecki. Fیزیologiczne i lecznicze działanie radu. Przegl. lek. 1909, Nr. 31.
- Reiter. Einfluß der Radium-Emanation auf die Phagocytose (Opsonine). Cntrbl. f. Röntgenstrahlen, Radium u. verwandte Gebiete. T. I, 1910.
- Sauerbeck. Experimentelle Studien über Phagocytose. Ztschr. f. Immunität und exper. Therapie, 1909.
- Sawtschenko, Barykin i Majkow. Archiv biolog. nauk. T. XV, Russkij Wratsch 1910, Nr. 22.
- Schütze. Über den Einfluß des Radiums auf die Produktion von Antikörpern im tierischen Organismus. Med. Klinik 1911.
- Wright. Studien über Immunisierung und ihre Anwendung in der Diagnose und Behandlung von Bakterieninfektionen. Jena 1909.
- Wright u. Stewart R. Douglas. Über die Wirkung der Blutflüssigkeiten auf den Tuberkelbacillus und die Entstehung von Schutzstoffen im menschlichen Organismus in Antwort auf die Inoculation eines Tuberkulosevaccins. Proceedings of the Royal Society, Vol. 74, 1904, cité par Wright.
-



*Studia nad Azotobakterem. I. Morfologia i cytologia. —*  
*Azotobacter-Studien. I. Morphologie und Cytologie.*

Mémoire

de M. A. **PRAŻMOWSKI** m. c.,

présenté dans la séance du 4 Mars 1912.

(Planches VII—IX).

**I. Der heutige Stand unseres Wissens vom Leben und von den Wirkungen des *Azotobacter chroococcum* Beijer.**

Bekanntlich hat Beijerinck (1) im Jahre 1901 aus dem Boden, später auch aus dem Kanalwasser in Delft einen Schizomyceten isoliert, welchen er wegen seines Verhaltens dem atmosphärischen Stickstoff gegenüber und seiner Eigenschaft, in einem bestimmten Lebensstadium ein braunes Pigment in sich aufzuspeichern, *Azotobacter chroococcum* benannte. Seit dieser Zeit ist *Azotobacter* Gegenstand sehr zahlreicher und eingehender Untersuchungen geworden, die sich einerseits auf sein Vorkommen in der Natur und seine morphologischen Merkmale und Besonderheiten, andererseits auf die Art und Weise seiner Ernährung, die Ursachen und Faktoren seines Stickstoffbindungsvermögens, schließlich auf seine Rolle im Haushalte der Natur und im landwirtschaftlichen Betriebe erstreckten. Diese Untersuchungen, die mit mehr oder weniger Geschick und Aufwand an Geist und Arbeitskraft in Angriff genommen und durchgeführt wurden, haben unstreitig nicht nur unsere Kenntnisse über diesen interessanten Mikroben sehr erweitert, sondern auch manche Tatsachen zutage gefördert, die in das Leben und Wirken der Mikrowelt einen tieferen Einblick gestatten; gleichzeitig haben dieselben zum Teil neue Gesichtspunkte und Perspektiven für die weitere Forschung eröffnet, zum anderen Teil aber auch manche Verwirrung und Konfusion in den Anschauungen über das



Wesen und die Wirkungsweise der kleinsten Lebewesen hinein-gebracht.

Aus diesem Grunde wird es vielleicht nicht nutzlos sein, wenn ich an dieser Stelle die wichtigsten Resultate der bisherigen Forschungen über *Azotobacter chroococcum* kurz zusammenfasse und dieselben auch insoferne kritisch beleuchte, um das Tatsächliche der Untersuchungsergebnisse von dem Hypothetischen, bezw. von den aus denselben gezogenen, nicht immer zutreffenden Schlüssen zu sondern. Diese Revue der *Azotobacter*-Literatur, welche, wie nochmals hervorgehoben werden soll, sich auf die wichtigsten, grundlegenden Arbeiten beschränken muß, wird mir auch Gelegenheit bieten, diejenigen Fragen, die mich besonders interessierten, und diejenigen Gesichtspunkte, von denen ich mich bei meinen eigenen Untersuchungen leiten ließ, in den Vordergrund treten zu lassen.

Was zuerst das Vorkommen des *Azotobacter* in der Natur anlangt, so hat schon Beijerinck in seiner ersten Mitteilung (1) darauf hingewiesen, daß derselbe in der Natur weit verbreitet sein muß, denn er hat ihn mit Ausnahme des Heidebodens aus allen anderen untersuchten Böden isoliert und auch im Kanalwasser von Delft zu wiederholten Malen gefunden. Spätere Forscher haben diesen Befund Beijerinck's voll bestätigt. Sie fanden, daß *Azotobacter* ein sehr verbreiteter und in den meisten Kulturböden fast nie fehlender Bewohner des Erdreichs ist; namentlich bevorzugt er kalkreiche und basisch reagierende Böden, meidet dagegen saure Moor-, Torf- und Heideböden. Ein gewisser Kalkgehalt scheint für sein Gedeihen unentbehrlich zu sein, denn Hugo Fischer (2 und 3) konnte ihn aus gekalkten Parzellen des Poppelsdorfer Versuchsfeldes leicht zur massenhaften Entwicklung und Isolierung bringen, während ungekalkte Parzellen ein negatives Resultat lieferten. Dieselbe Beobachtung machten später Krzemieniewski (4), Christensen (5), Schneider (6) und a.; Christensen versuchte sogar auf Grund dieser Tatsache die Kalkbedürftigkeit der Kulturböden in mit den betreffenden Böden geimpften Nährlösungen biologisch zu bestimmen. Aber auch in Moor-, Torf- und Heideböden konnte das Vorkommen von *Azotobacter* öfter nachgewiesen werden, z. B. durch von Feilitzen (7), sobald diese Böden sich längere Zeit in Kultur befanden und durch kulturelle Maßregeln eine durchgreifende Änderung ihrer physikalisch-chemischen



mischen Zusammensetzung erfahren. Bezüglich der geographischen Verbreitung scheint aus den vorliegenden Untersuchungen hervorzugehen, daß *Azotobacter* über die ganze Erde verbreitet ist und auch im hohen Gebirge, soweit bebauete Flächen und Pflanzensiedlungen reichen, angetroffen wird. Doch ist das Vorkommen von *Azotobacter* nicht bloß auf das feste Land beschränkt. So wurde er z. B. im Meere, und zwar in der Ostsee zuerst von Benecke und Keutner (8) nachgewiesen, und zwar sowohl auf dem Meeresgrunde im Schlick, als auch im Meerwasser nahe der Oberfläche, wo er sich an den schleimigen Zellwänden der Meeresalgen und überhaupt der Planktonvegetation massenhaft ansiedelt. Dieser Befund wurde durch weitere Forschungen bestätigt und das Vorkommen des *Azotobacter* auch in anderen salzreicheren Meeren (in der Nordsee, im Mittelländischen Meer u. s. w.) konstatiert. Dergleichen hat man auch in süßen Gewässern des Festlandes nach *Azotobacter* nicht vergebens gesucht; auch hier hat man ihn zu meist in Vergesellschaftung mit grünen und blaugrünen Algen gefunden. Aus allen diesen Tatsachen kann der Schluß gezogen werden, daß *Azotobacter chroococcum* ein in der Natur überaus, vielleicht sogar allgemein verbreiteter und mit Rücksicht auf die Verschiedenheit der Standortsverhältnisse seines Vorkommens ein wohl sehr anpassungsfähiger Organismus ist. Leider ist die Frage seiner Anpassungsfähigkeit an die äußeren Bedingungen des Lebens in den vorliegenden Untersuchungen kaum gestreift worden; was darüber zur Zeit bekannt ist, soll noch weiter unten zur Sprache kommen.

Mit der allgemeinen Verbreitung und der daraus logisch zu fordernden Anpassungsfähigkeit des *Azotobacter chroococcum* ist die Frage nach der Gattungs- und Speziesbegrenzung dieses Organismus eng verknüpft; auch die Frage nach der Rassen-, bzw. Varietätenbildung innerhalb des Speziesbegriffes hängt damit innig zusammen. Eine klare und sichere Antwort auf diese Fragen, welche von einschneidender Bedeutung sowohl für die Stellung des *Azotobacter* im System, als auch für das Verständnis der physiologischen Lebensäußerungen dieses Organismus sind, könnte nur auf Grund eingehender morphologisch-entwicklungsgeschichtlicher Untersuchungen gegeben werden. In dieser Beziehung weisen leider die bisherigen Forschungen eine große Lücke auf — und man kann ruhigen Gewissens sagen, daß wir über die Morphologie und



Entwicklungsgeschichte des *Azotobacter chroococcum* kaum etwas mehr als dasjenige wissen, was Beijerinck in seiner grundlegenden ersten Publikation (1) darüber mitteilt. Freilich waren auch die Angaben Beijerinck's über diesen Gegenstand nicht nur ganz allgemein gehalten, aber auch ziemlich spärlich und nicht lückenlos. Er beschrieb einfach die in Roh- und Reinkulturen nebeneinander oder auch nacheinander auftretenden morphologischen Formen, ohne nachzuweisen, daß sie wirklich zueinander gehören, wie sich eine aus der anderen entwickelt und welche Rolle ihnen im Leben des *Azotobacter* zukommt. Es soll ihm jedoch deshalb an dieser Stelle kein Vorwurf gemacht werden, da der Zweck seiner grundlegenden Arbeit auf einem anderen Gebiete lag. Nach Beijerinck ist *Azotobacter chroococcum* in seinem Jugendstadium ein Stäbchen von 4  $\mu$  Breite und 5—7  $\mu$  Länge, welches im späteren Alter sich in winzige, mit dicken Schleimhüllen umgebene Kokken verwandelt, die schließlich nach Auflösung der Schleimhüllen sich zu sarcinaartigen Paketen vereinigen; letztere sind als Dauerformen zu betrachten, sind aber keine eigentlichen Sporen, da *Azotobacter* solche gar nicht erzeugt. Schließlich stellt Beijerinck für die neue Gattung *Azotobacter* zwei Arten auf: *A. chroococcum*, welche durch schwache Eigenbewegung im jugendlichen Stäbchenstadium, einzelne polare Geißeln, Bildung von sarcinaartigen Dauerformen und einem rotbraunen Pigment in den Dauerformenzellen charakterisiert wird, — und *A. agile*, durch größere Zellen, lebhaftere Beweglichkeit, polare Geißelbüschel und Mangel von Dauerformen und Pigmentbildung von der ersteren Art unterschieden. Spätere Forschungen haben unsere Kenntnisse über die Morphologie des *Azotobacter* nur sehr wenig bereichert; manche von ihnen haben sogar den morphologischen Entwicklungskreis dieser Art bedeutend eingeengt. So hat Lipman (9) in Amerika aus den dortigen Böden mehrere *Azotobacter*-formen gewonnen, von denen eine, die er mit dem Speziesnamen *A. vinelandii* belegte, zeitweilig nur in Sarcinaform wächst, und eine andere, als *A. Beijerinckii* bezeichnete, nur in aus kurzen, ovalen, kokkenförmigen Gliedern bestehenden Ketten auftritt. Noch weiter geht Hugo Fischer (2), welcher im normalen Entwicklungsgange des *Azotobacter chroococcum* nur kugelige Formen beobachtete und ihn deshalb zu den Kugelbakterien oder Coccaceen stellte. Auch zahlreiche andere Forscher haben aus dem Erdboden *Azotobacter*-



formen isoliert, welche vorwiegend oder sogar ausschließlich in Kokkenform auftraten und Stäbchenformen nur ausnahmsweise oder gar nicht entwickelten. Sämtliche Forscher stimmen auch mit Beijerinck damit überein, daß die in Schleimhüllen eingebetteten Kokken eine regelmäßige, nie fehlende Erscheinung sind und zum normalen Entwicklungsgang des *Azotobacter* gehören. Die wichtige Frage, in welchem Verhältnis die aus verschiedenen Erdteilen und Standorten isolierten *Azotobacter*-formen zueinander stehen, ob dieselben als distinkte Arten, oder vielmehr als Rassen, bezw. Anpassungsformen einer und derselben Art aufzufassen sind, haben Löhnis und Westermann (10) zu lösen versucht. Die umfangreichen, mit verschiedenen festen und flüssigen Nährsubstraten ausgeführten Versuche mit zusammen 21 *Azotobacter*-stämmen (darunter 4 Originalstämmen Beijerinck's von *A. chroococcum* und 1 Originalstamm von *A. agile* und mehrere Originalstämmen Lipman's von *A. chroococcum*, *A. vinelandii* und *A. Beijerinckii*) führten jedoch zu keinem entscheidenden Urteil. Zwar haben die genannten Forscher keine scharfen Grenzen zwischen den einzelnen typischen Arten, resp. Stämmen finden können und konnten feststellen, daß dieselben durch zahlreiche atypische oder Übergangsformen miteinander verbunden sind, beobachteten auch manchmal, daß eine sich konstant vererbende Form auf einmal ohne nachweisbare Ursache in eine andere überschlägt, trotzdem wagten sie es nicht, die Berechtigung der von den verschiedenen Autoren aufgestellten Spezies ernstlich in Frage zu stellen, haben vielmehr die Zahl der *Azotobacter*-spezies noch um eine neue, durch vollständigen Mangel von Stäbchenformen charakterisierte Art, *A. vitreum*, bereichert. Faßt man die Ergebnisse sämtlicher morphologischen und entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen über *Azotobacter* zusammen, so ergibt sich, daß auf diesem Gebiete seit Beijerinck's erster Publikation kein Fortschritt, in gewissem Sinne eher sogar ein Rückschritt zu verzeichnen ist. Man hat zwar die schon von Beijerinck beobachteten Wuchsformen um etliche neue vermehrt und auf Grund dieser Wuchsformen neue Arten aufgestellt, sobald dieselben mit einer gewissen Regelmäßigkeit oder Konstanz zum Vorschein traten, es fehlt jedoch der strikte Nachweis, daß diese Wuchsformen konstante morphologische Merkmale besitzen und nicht Ernährungsmodifikationen oder Anpassungsformen an bestimmte äußere Bedingungen bilden. Auch ist von keinem der zahlreichen



Forscher, die sich mit diesen Fragen beschäftigten, ein ernstlicher Versuch gemacht worden, den genetischen Zusammenhang der verschiedenen Wuchsformen, unter welchen *Azotobacter* auftritt, zu erforschen und damit auch seine Morphologie auf entwicklungsgeschichtlicher Grundlage klarzulegen. Die natürliche Folge dieser Vernachlässigung ist, daß wir heutzutage zwar wissen, daß *Azotobacter* sehr variabel ist, aber die Grenzen dieser Variabilität im Bereiche des Gattungs- und Speziesbegriffes nicht kennen und daß wir uns ebenso über die Stellung dieser Gattung im System und über die Berechtigung der unterschiedenen Arten kein Urteil bilden können. Es ist auch einleuchtend und braucht nicht eines besonderen Beweises, daß diese Lücke in unseren Kenntnissen über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte des *Azotobacter* auch für die richtige Erkenntnis der physiologischen Erscheinungen seines Lebens von nachteiligen Folgen sein muß, ja diese Erkenntnis ungemein erschwert oder gar unmöglich macht, solange wir nicht wissen, in welchem Verhältnis die einzelnen *Azotobacter*-formen zueinander stehen und ob die mit einer bestimmten *Azotobacter*-form erhaltenen Resultate auch auf andere Formen übertragen werden können.

Das wichtige und mit der Morphologie der einzelligen Organismen so innig verknüpfte Gebiet der cytologischen Erscheinungen des Lebens ist in den vorliegenden Untersuchungen über *Azotobacter* kaum gestreift worden. Man findet nur zerstreute Angaben über die in den verschiedenen Wuchsformen auftretenden Einschlüsse, wie metachromatische Körnchen, Volutin-, Glykogen- und Fetttröpfchen, aber die meisten dieser Beobachtungen wurden nur *en passant* bei Gelegenheit anderer Untersuchungen gemacht. Über eine erst im letzten Jahre erschienene Publikation Em. Mencl's (11), welche sich ausschließlich mit cytologischen Fragen beschäftigt, sowie über die wenigen zerstreuten Angaben cytologischen Inhalts bei anderen Forschern soll im entsprechenden Abschnitt meiner eigenen Untersuchungen weiter unten gehandelt werden.

Viel zahlreicher, aber auch ausgiebiger in den Resultaten waren die physiologischen Untersuchungen über die Ernährungsweise des *Azotobacter chroococcum*. In erster Linie interessierte die schon von Beijerinck wahrgenommene Eigenschaft dieses Mikroben, den freien atmosphärischen Stickstoff zu binden und für den Ausbau seiner Leibessubstanz zu verwerten. Zwar hat Beijerinck in



einer späteren, zusammen mit seinem Schüler van Delden durchgeführten Arbeit (12) diese seine Ansicht dahin geändert, daß Azotobacter nur in Gemeinschaft mit anderen Mikroben die Fähigkeit erlangt, den atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren, doch haben die fast gleichzeitig von Gerlach und Vogel (13) durchgeführten Versuche nachgewiesen, daß Azotobacter einer Mithilfe von anderen Mikroorganismen nicht bedarf, um seine Fähigkeit der Stickstoffbindung zur Geltung zu bringen. Auch andere Forscher, welche die Versuche von Beijerinck, bezw. von Gerlach und Vogel wiederholten, konnten die Resultate der letztgenannten Forscher bestätigen. Immerhin blieb die Frage noch weiter offen, ob die Mitwirkung anderer Mikroben für die Stickstoffbindungsfähigkeit des Azotobacter, wenn nicht unumgänglich notwendig, so doch wenigstens förderlich ist, denn die in Reinkulturen von Azotobacter erzielten Stickstoffgewinne standen hinter den in Roh-, bezw. Mischkulturen erlangten meistens sehr bedeutend zurück. Diese mit der Zeit und der Zahl der neuen Versuche sich immer mehr anhäufenden Widersprüche zu lösen, gelang es erst Krzemieniewski (14), welcher durch seine umfassenden, methodisch einwandfreien und sorgfältigst ausgeführten Versuche den strikten Beweis lieferte, daß Azotobacter in Reinkulturen, demnach für sich allein und ohne Mitwirkung anderer Organismen die gleichen oder sogar größere Mengen Luftstickstoff zu binden vermag, wenn ihm außer der nötigen Energiequelle und den mineralischen Nährsalzen Humussubstanzen des Bodens in entsprechender Form und entsprechender Menge geboten werden. Durch diese Entdeckung Krzemieniewski's fanden die in Rohkulturen, zu denen humose Erde als Impfmateriale benutzt wurde, festgestellten ansehnlichen Stickstoffgewinne ihre einfache und natürliche Erklärung. Krzemieniewski hat zugleich nachgewiesen, daß Humusstoffe dem Azotobacter weder als Kohlenstoffquelle, noch höchst wahrscheinlich als Stickstoffquelle dienen können, und hält es für wahrscheinlich, daß die Wirkungen des Humus entweder auf seinen Gehalt an mineralischen Bestandteilen oder vielleicht auf dessen physikalische Eigenschaften zurückzuführen sind. Schließlich spricht sich dieser Forscher auf Grund seiner Versuche und Beobachtungen dafür aus, daß Azotobacter je nach seiner Herkunft und Ernährungsweise physiologische Rassen bildet, die die Fähigkeit der Stickstoffbindung in verschiedenem Grade besitzen.



Die Entdeckung Krzemieniewski's, daß die Humusstoffe des Bodens die natürlichen Träger, bezw. Vermittler der Stickstoffbindungsfähigkeit des Azotobacter sind, führte logischerweise zum Aufwerfen der Frage, in welcher Weise dieselben wirken und an der Bindung des freien Stickstoffs durch Azotobacter sich beteiligen. Eine weitere Frage, die sich an diese Entdeckung knüpfte, war naturgemäß die, ob es auch andere Substanzen gibt, die in ähnlicher Weise wie die Humusstoffe wirken, bezw. letztere in ihren Wirkungen ersetzen können.

In bezug auf die erste der aufgeworfenen Fragen hat die Gemahlin des letztgenannten Forschers Frau Helene Krzemieniewska (15) einen sehr wichtigen, aber augenscheinlich wenig beachteten Beitrag geliefert. Sie stellte fest bei Gelegenheit ihrer ebenfalls mit viel Scharfsinn und Sorgfalt angestellten Versuche über den Bedarf des Azotobacters an mineralischen Nährstoffen, daß die in den Humussubstanzen (humussaures Natrium) enthaltenen Nährstoffe von Azotobacter zur Deckung seines Bedarfs an diesen Nährstoffen entweder gar nicht oder wenigstens nicht in nennenswerten Mengen herangezogen werden. Gleichzeitig wurde durch Frau Krzemieniewska der Beweis erbracht, daß entgegen den Versuchsergebnissen von Gerlach und Vogel (16), nach welchen nur Kalzium, Phosphorsäure und Schwefelsäure für die Ernährung des Azotobacter und seine Fähigkeit der Stickstoffbindung notwendig sein sollen, in erster Linie Kalium, in zweiter Linie auch Magnesium unentbehrlich sind. Auf Chlor und Eisen wurden die Versuche nicht ausgedehnt, doch meint die Verf., daß beide Stoffe entweder entbehrlich sind oder in solchen Spuren schon genügen, wie sie mit dem Impfmateriale oder mit den Reagenzien in die Nährlösungen gelangten. Entgegen diesen Befunden glaubte Kaserer (16) aus seinen Versuchen schließen zu müssen, daß Azotobacter und andere Bodenbakterien außer den sonstigen Mineralbestandteilen zu ihrer normalen Entwicklung noch Eisen- und Aluminium-, wahrscheinlich auch Manganverbindungen in größerer Menge in den Nährsubstraten vorfinden müssen, -- und meint, daß der fördernde Einfluß der Humate auf die Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobacter durch deren Gehalt an diesen Stoffen bedingt wird. Zu anderen und in mancher Beziehung sehr interessanten Schlüssen gelangten Th. Remy und G. Rösing (17), welche sich die Aufgabe stellten, die Wirkungsweise der Humus-



stoffe auf die Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobacter zu erforschen. Übereinstimmend mit Krzemieniewki's Befunden stellten die genannten Forscher zuerst fest, daß die Wirkung der aus dem Boden gewonnenen Humate je nach der Art des Bodens und der Methode der Gewinnung sehr verschieden ist. — und ergänzten diese Befunde dahin, daß die fördernde Wirkung der Humate mit ihrem Gehalt an Eisen- und Silikatverbindungen steigt und fällt; dagegen scheinen Aluminiumverbindungen ganz wirkungslos zu sein und in größerer Menge eher einen hemmenden als fördernden Einfluß auszuüben. Die eigentlichen Träger der günstigen Wirkung von Humusstoffen auf Azotobacter sind die Eisenverbindungen, welche auch in Abwesenheit der Humate für sich allein die Stickstoffbindungsfähigkeit des Azotobacter beträchtlich steigern. Die durch Extrahierung mit Salzsäure ihrer Eisen- und Silikatverbindungen beraubten Bodenhumate sowie die künstlichen Humusstoffe des Handels (Birkacid und dergl.) erweisen sich als ebenso wirkungsvoll, wie die natürlichen Humate, sobald man ihnen Eisen in ausreichender Menge und in passender Form zusetzt. Als passendste Form des Eisens wurde Ferrohydroxyd, in Rohrzucker gelöst, dann Eisensilikat befunden. Daß Eisenverbindungen für sich allein oder in Verbindung mit Humussäure als Nährstoffe günstig wirken, ist nach Ansicht der Verfasser aus allgemeinen Erwägungen und mit Rücksicht auf die in Betracht kommenden Mengen des Eisens nicht anzunehmen; viel wahrscheinlicher ist es, daß dieselben mittelbar die Azotobacterentwicklung fördern; worauf jedoch diese indirekte Wirkung beruht, soll erst durch weitere Untersuchungen der Verf. aufgeklärt werden.

Ich habe die Resultate der Versuche von Remy und Rösing an dieser Stelle ausführlicher behandelt, weil dieselben nicht nur einiges Licht auf die Frage der Wirkungsweise von Humusstoffen verbreiten, sondern auch feststellen, daß es außer den organischen Humussubstanzen auch mineralische Substanzen, wie Eisenhydroxyd und Eisensilikat gibt, welche das Leben und Wirken des Azotobacter in gleichem Sinne fördernd beeinflussen. Somit wäre auch die an zweiter Stelle bezüglich der Wirkungsweise von Humusstoffen gestellte Frage, ob es auch Stoffe gibt, die in gleichem Sinne, wie Humussubstanzen wirken, bzw. dieselben ganz oder teilweise ersetzen können, im bejahenden Sinne entschieden. Als solche Stoffe können wir zur Zeit, nach den Untersuchungen von



Remy und Rösing, Eisenhydroxyd und Eisensilikat betrachten. Die Tatsache, daß Eisenhydroxyd in Zuckerlösung im gleichen Sinne, wie natürliche Humusstoffe wirkt, habe ich übrigens unabhängig von Remy und Rösing zu einer Zeit, als ich deren Publikation noch nicht kannte, feststellen können.

Betrachtet man nach dem Vorstehenden als feststehende Tatsache, daß Humusstoffe und Eisenhydroxyd in gelöster Form in gleicher Weise, wenn auch graduell verschieden auf Azotobacter wirken, so muß man in Anbetracht des Umstandes, daß Lösungen dieser beiden Körper kolloider Natur sind, die Frage aufwerfen, ob auch andere Kolloide die gleiche, wenn auch graduell verschiedene Wirkung ausüben. Dafür würde die von Remy und Rösing für Silikate beobachtete günstige Wirkung, dagegen die Wirkungslosigkeit oder gar hemmende Wirkung der Aluminiumverbindungen sprechen; doch ist aus den Versuchen der genannten Forscher nicht zu ersehen, ob die Wirkungslosigkeit der Aluminiumverbindungen nicht etwa auf die ungünstige Form der gebotenen Lösung (Natriumaluminat in NaOH gelöst) zurückzuführen wäre. Auch in der sonstigen Literatur über Azotobacter finden sich keine Anhaltspunkte zur Beurteilung dieser Frage.

Eine weitere Frage, die sich an die soeben diskutierte eng anschließt, ist, ob es auch andere mineralische oder organische Substanzen nicht kolloidaler Natur gibt, welche ähnlich den kolloidalen Humaten und dem kolloidalen Eisenhydroxyd in Zuckerlösung günstig auf die Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobacter wirken. Diese Frage muß auf Grund der vorliegenden Azotobacter-Literatur, wenigstens in bezug auf den kohlen-sauren Kalk, entschieden bejaht werden. Es ist eine allgemein bekannte und von zahlreichen Forschern zu wiederholten Malen festgestellte Tatsache, daß Azotobacter kalkreiche Böden bevorzugt und in kalkarmen sich auf den gekalkten Parzellen massenhaft ansiedelt und kräftig entwickelt. Diese Tatsache wurde zuerst von Hugo Fischer festgestellt, welcher in seiner schon oben zitierten Arbeit (2, S. 143) aus seinen Versuchen und Beobachtungen den Schluß zieht, „daß für die Bodenverhältnisse des Poppelsdorfer Versuchsfeldes ein Kalkgehalt von 0.1% die untere Grenze ist, bis zu welcher Azotobacter eine reichere Entwicklung finden und eine ausgiebige Tätigkeit entfalten kann; dagegen scheint für ihn eine obere Grenze des Kalkgehaltes nicht zu existieren“. In ähnlichem Sinne sprechen



sich auch spätere Forscher, wie Christensen (18), Krzemieniewski (4), Ph. Schneider (6) und a. über die fördernde Wirkung des Kalkgehaltes des Bodens auf Azotobacter aus. Auch in künstlichen Kulturen auf festen Substraten und in Nährlösungen hat man durch Zusatz von kohlensaurem Kalk sehr günstige Resultate nicht nur in der Vegetation, sondern auch in Stickstoffbindung erzielt. Bekanntlich wird der in Amerika mit Vorliebe für Azotobacterkulturen angewendeten Ashby'schen Nährlösung  $\text{CaCO}_3$  im Ausmaß von 5 Gramm per Liter Wasser beigegeben und Omielański (19) ist in seinen Kulturen auf Agarnährböden bis zu 20 Gramm  $\text{CaCO}_3$  per 1000 ccm Wasser gegangen und hat bei diesem Zusatz sehr günstige Resultate (in bezug auf Entwicklung und Pigmentbildung) erzielt. Remy und Rösing haben ebenfalls bei Zusatz von 10 Gramm  $\text{CaCO}_3$  auf 100 ccm Mannitnährlösung sehr günstige Wirkung beobachtet und konnten für diese Kultur einen Stickstoffgewinn von 6.97 mg nachweisen, während die mit natürlichem Natriumhumat versetzte Parallelkultur einen solchen von 10.73 mg ergab. Daß es sich bei diesen Gaben von  $\text{CaCO}_3$  nicht um seine Wirkungen als Nährstoff handeln kann, wie Christensen (5) meint, liegt auf der Hand, nachdem durch Frau Krzemieniewska (15) nachgewiesen wurde, daß schon ein Zusatz von 0.36 mg Ca pro 1 Gramm Glukose zur normalen Ernährung und zur ökonomischen Verwertung dieser Energiequelle für die Stickstoffbindung ausreicht. Ebenso kann der von Remy und Rösing konstatierte namhafte Stickstoffgewinn von 6.97 mg bei Zusatz von 10 Gramm  $\text{CaCO}_3$  nicht auf die Verunreinigung des angewendeten kohlensauren Kalks mit Eisenverbindungen zurückgeführt werden, womit die beiden Forscher die Sache als abgetan betrachteten, wenn man bedenkt, daß Eisenverbindungen in der günstigsten Form als Eisenhydroxyd in Zuckerlösung erst bei einer Gabe von 15 mg einen Stickstoffgewinn von 7.88 mg lieferten, und nicht kolloide Eisenverbindungen sich als wenig wirksam oder unwirksam erwiesen. Somit kann es keinem Zweifel unterliegen, daß auch der kohlensaure Kalk analog den Humusstoffen und Eisenhydroxydlösungen für sich allein einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobacter ausübt. Freilich bleibt dabei, wie bei den kolloid löslichen Humusstoffen und Eisenverbindungen noch die Frage offen, worauf diese günstige Wirkung beruht.



Ob es noch andere nicht kolloidale Stoffe in den natürlichen Wohnstätten des Azotobacter, d. h. im Boden und in den Gewässern gibt, die im gleichen Sinne auf Azotobacter wirken können, darüber finden sich in der mir bekannten Literatur weder präzise Angaben, noch irgend welche greifbare Anhaltspunkte. Es mag nur erwähnt werden, daß Christensen in seiner neuen Publikation (18) beiläufig bemerkt, daß der kohlen saure Kalk durch kohlen saure Magnesia ersetzt werden kann, doch bringt er für diese seine Behauptung keine auf Versuchsergebnisse und Zahlen basierten Beweise und es ist aus dem Zusammenhange auch nicht zu entnehmen, ob es sich um direkte Nährwirkungen oder um andere indirekte Wirkungen der kohlen sauren Magnesia handelt. Auch Schneider (6) hat die günstige Wirkung der kohlen sauren Magnesia auf die Stickstoffbindung des Bodens beobachtet, aber ebenfalls keine methodischen Versuche über die Wirkungsweise dieses Stoffes angestellt.

Andere Untersuchungen stellten sich die Aufgabe, die bei der Stickstoffbindung des Azotobacter im Nährboden stattfindenden stofflichen Veränderungen und im Zusammenhang damit den Verbrauch an Sauerstoff und die Art und Menge der ausgeschiedenen Gase zu erforschen, um dadurch ein möglichst genaues Bild des Stoffwechsels, bezw. der bei der Entwicklung des Azotobacter sich abspielenden Ernährungs- und Umsetzungsprozesse zu erlangen. Auch hier waren grundlegend und ausschlaggebend für den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse von Azotobacter die Arbeiten von Krzemieniewski, welcher übereinstimmend mit Beijerinck's Beobachtungen und Angaben den Beweis erbrachte, daß Azotobacter ein ausgesprochener Aerob ist, bei Luftabschluß sich gar nicht entwickelt, geschweige denn irgend welche Gärung oder andere Zersetzungen im Nährsubstrat hervorbringt und als einziges Produkt des Gasaustausches nur Kohlendioxyd ausscheidet, wobei das Verhältnis des ausgeschiedenen Kohlendioxyds zum verbrauchten Sauerstoff sich der Einheit nähert. Je größer die Stickstoffbindung, desto höher ist auch sein Verbrauch an Sauerstoff und desto größer auch die Menge des ausgeschiedenen  $\text{CO}_2$ . Eine Ausscheidung von Wasserstoff oder eine Bildung von Alkohol und organischen Säuren (Ameisen-, Essig-, Milch-, Buttersäure), wie dies von Stoklasa (20) behauptet wurde, findet in Reinkulturen von Azotobacter nicht statt; die dem Azotobacter als Energiequelle dar-



gebotenen Kohlenstoffverbindungen werden zum größten Teil zur Unterhaltung des Atmungsprozesses, zum anderen Teil zum Aufbau der eigenen Leibessubstanz verwendet. Auch diese Resultate wurden durch Untersuchungen anderer Forscher vollauf bestätigt.

Mit Rücksicht auf das starke Sauerstoffbedürfnis des *Azotobacter* wären Versuche über den Einfluß der Sauerstofftension auf die Entwicklung und Stickstoffbindung dieses Organismus von Interesse gewesen; doch sind solche Versuche, welche vielleicht einen Einblick in die Art und Weise der günstigen Einwirkung von Humusstoffen und anderen Substanzen gewähren möchten, meines Wissens von niemand noch ausgeführt worden. Nur Omiełński (19) versuchte, den *Azotobacter* in reiner Sauerstoffatmosphäre zu züchten und fand, wie auch nicht anders zu erwarten war, daß der reine Sauerstoff seine Entwicklung hemmt und sein Leben vernichtet.

Somit wären wir mit der Übersicht der wichtigsten Arbeiten auf dem Gebiete der *Azotobacter*forschung sowie mit den Problemen, die sich aus den Resultaten dieser Arbeiten für die weitere Forschung ergeben, am Ende angelangt. Bezüglich dieser Probleme bemerke ich noch, daß ich bloß die zunächst liegenden und aus den beobachteten Tatsachen und festgestellten Befunden sich unmittelbar ergebenden Fragen ins Auge gefaßt habe, deren Lösung zum richtigen Verständnis sowohl der Einzelercheinungen, als auch des inneren kausalen Zusammenhanges zwischen diesen Erscheinungen wünschenswert und nutzbringend wäre. Ich gehe nun zur Darstellung meiner eigenen Untersuchungen über.

## II. Eigene Untersuchungen und deren Methoden.

Ich bin an die Untersuchungen von *Azotobacter chroococcum* ursprünglich mit der Absicht herangetreten, um nach einer langen Reihe von Jahren, wo ich auf einem anderen Arbeitsgebiete tätig gewesen war, mich über die in der Zwischenzeit neu entdeckten und besonders interessanten Formen der Bakterien zu informieren, und es war nicht meine Absicht, diese Bakterie zum Gegenstand eines eingehenden Studiums zu machen. Allein schon die ersten orientierenden Beobachtungen und Versuche, die ich an und mit *Azotobacter* anstellte, ließen gewisse Zweifel in mir aufsteigen über dasjenige, was ich in der Literatur gefunden und gelesen habe. So oft ich



aber diese Zweifel durch neue Beobachtungen und Wiederholung der Versuche zu beseitigen suchte, fand ich wieder dasselbe und stieß auf neue Erscheinungen und Tatsachen, die mit den zur Zeit geltenden Anschauungen und Behauptungen nicht in Einklang zu bringen waren. So wurde ich gegen meine ursprüngliche Absicht in den Kreis dieser Untersuchungen hineingezogen, da mit jedem Versuche und mit jeder neuen festgestellten Tatsache sich neue Gesichtspunkte, neue Ausblicke und neue Wege zur Erforschung seines Wesens und seiner wahren Natur eröffneten. Als Landwirt interessierten mich vor allem die Stickstoffbindungsfähigkeit des *Azotobacter* und die näheren Bedingungen, unter welchen er diese Fähigkeit entwickelt; als Botaniker sah ich besonders die großen Lücken, die in unseren Kenntnissen über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte des *Azotobacter* in der Wissenschaft auszufüllen waren. Es war mir auch klar, daß ein richtiges Erfassen und ein tieferes Eindringen in die verwickelten und chemisch trotz aller Erklärungsversuche nicht definierbaren Prozesse der Stickstoffbindung seitens des *Azotobacter* erst dann möglich sein wird, wenn es gelingt sicherzustellen, in welchem Lebensstadium er diese Fähigkeit entwickelt, wie seine Zellen alsdann beschaffen sind und durch welche Eigenschaften sich dieselben sowohl der äußeren Form nach, als auch in bezug auf die innere Struktur und den Zellinhalt auszeichnen. Tatsächlich haben mich schon die ersten Untersuchungen belehrt, daß die humushaltigen und stark assimilierenden *Azotobacter*kulturen ein ganz anderes Bild gewähren, als unter entgegengesetzten Verhältnissen. Daraus ergab sich, abgesehen von rein botanisch-wissenschaftlichem Interesse, die Notwendigkeit, den morphologischen Entwicklungsgang des *Azotobacter* in allen seinen Phasen und Modifikationen zu verfolgen und möglichst allseitig kennen zu lernen. Im Laufe dieser morphologischen Untersuchungen bin ich auf Strukturen und andere Erscheinungen in den *Azotobacter*zellen gestoßen, welche die definitive Lösung der vielfach umstrittenen Frage des Vorhandenseins oder Fehlens eines Zellkerns bzw. Zellkernäquivalents in Aussicht stellten. So geschah es, daß die anfänglich rein morphologischen Untersuchungen auch auf das cytologische Gebiet ausgedehnt werden mußten. Die Vielgestaltigkeit des *Azotobacter* und die Mannigfaltigkeit der Bilder, welche seine Kulturen je nach den äußeren Lebensbedingungen zeigen, nicht minder die zuweilen ganz unvermittelt und jäh eintretende Ver-



änderlichkeit des Vegetationsbildes unter verschiedenen, aber auch unter gleichen Ernährungs- und sonstigen Bedingungen veranlaßten mich, auch die Frage der Rassenbildung und der Arteneinheit oder Artenverschiedenheit der morphologisch differenzierten Azotobacterformen in den Kreis der Untersuchungen einzubeziehen. Da auch die physiologischen Fragen der Ernährung und Stickstoffbindung nicht außer acht gelassen werden konnten, so erweiterte sich das Untersuchungsgebiet immer mehr und mehr und ging über die anfangs gesteckten Ziele weit hinaus. Die Probleme, deren Lösung für die Erkenntnis der wahren Natur des Azotobacter mir wichtig oder nutzbringend erschien, wurden zum Teil im einleitenden Kapitel bei der Übersicht der Literatur skizziert; andere Probleme drängten sich im Laufe der Untersuchungen von selbst auf. Selbstverständlich konnten nicht alle diese Probleme gleichmäßig behandelt und zur endgültigen Lösung gebracht werden; immerhin förderten die angestellten Versuche und Beobachtungen manche Tatsachen zutage, die als Anhaltspunkte und Wegweiser für weitere Untersuchungen förderlich sein können, weshalb sie auch an entsprechender Stelle kurz erwähnt werden sollen. Dies scheint mir um so mehr angezeigt zu sein, als in dieser Publikation die verschiedenen Lebenserscheinungen des Azotobacter, wie sie in der morphologischen Gestaltung der Zelle, ihrer inneren Struktur und physiologischen Eigenschaften zum Ausdruck kommen, im kausalen Zusammenhange untereinander und in bezug auf die äußeren Faktoren dargestellt werden sollen — und der erste Versuch gemacht werden soll, die durch frühere und meine eigenen Untersuchungen festgestellten Tatsachen von einem einheitlichen Gesichtspunkte aus zu behandeln und dem Verständnis näher zu bringen.

Bezüglich der Methoden, deren ich mich bei diesen Untersuchungen bedient habe, ist im allgemeinen so viel zu sagen, daß dieselben der Natur der zu lösenden und auf verschiedene Forschungsgebiete sich erstreckenden Fragen angepaßt waren; sie sollen in den weiteren Kapiteln über Morphologie, Cytologie, Physiologie und Biologie, soweit erforderlich, des Näheren mitgeteilt werden. An dieser Stelle mag nur über den Gang der Untersuchungen, die angewandten Nährmedien und dergl. kurz referiert werden.

Den Gegenstand der Untersuchungen bildeten zwei Stämme des *A. chroococcum*, von denen der eine im Jahre 1906 aus dem Boden des Versuchsfeldes des hiesigen landwirtschaftlichen Studiums von



Krzemieniewski isoliert und seit dieser Zeit durch Überimpfungen auf frischen Agarnährboden im agrikulturchemischen Institut der hiesigen Universität in Reinkultur fortgezüchtet wurde. Der zweite Stamm wurde von mir aus der Gartenerde des neuen landwirtschaftlichen Instituts isoliert. Beide Stämme, welche sich durch Bildung eines braunschwarzen, in ältern, üppigen Kulturen beinahe pechschwarzen Pigments auszeichnen, erwiesen sich in Kulturen auf gleichen Nährböden und unter gleichen Bedingungen beinahe identisch; jedenfalls sind die Unterschiede zwischen ihnen verschwindend klein gegenüber jenen Veränderungen und Abweichungen, welche jede von ihnen unter dem Wechsel der äußeren Faktoren, namentlich aber der Ernährungsbedingungen, erleidet.

Diese beiden Formen wurden teils in Nährlösungen, teils auf festem Agarnährboden gezüchtet. Für physiologische Versuche wurden ausschließlich Nährlösungen von verschiedener Zusammensetzung mit und ohne Zusatz von Kolloid- und anderen, durch hohe Ab- und Adsorptionskraft sich auszeichnenden Substanzen, für morphologische und biologische Untersuchungen sowohl flüssige als auch feste Nährböden mit und ohne diese Zusätze verwendet. Bei den ersten orientierenden Kulturen kamen Beijerinck'sche Mannitlösung und Mannitagar, Glukoselösung und Glukoseagar von Gerlach und Vogel, zum Teil auch Nährböden anderer Forscher in Anwendung; später wurde sowohl für Vorversuche als auch für Hauptversuche für flüssige und feste Nährböden eine Grundlösung von folgender Zusammensetzung verwendet:

Aq. dest. . . . .	1000 00	cm <sup>3</sup>
Glukose . . . . .	15 00	g
CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O . . . . .	0 40 bis 0 50	"
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0 02 "	0 05 "
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	0 25 "	0 50 "
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O . . . . .		0 10 "
NaCl . . . . .		0 10 "

Die vollen Gaben an Nährsalzen wurden für Nährlösungen, die kleineren Gaben für Agarnährböden in Anwendung gebracht. Außerdem wurden den Nährlösungen pro Liter 10 Tropfen einer 10%-igen Lösung von Eisenchlorid zugesetzt; bei Agarnährböden kam dieser Zusatz in Wegfall, da auch das sorgfältigst gereinigte



Agar-Agar genügende Mengen von Eisenverbindungen enthält. Agarnährböden bereitete ich in der Weise, daß das abgewogene Agar-Agar nach Abspülung der oberflächlich anhaftenden Verunreinigungen mit destilliertem Wasser in einen aus dichter Mousselin-gaze verfertigten Sack eingebracht und in großen Mengen destillierten Wassers 30—36 Stunden lang gequollen wurde. Nach dieser Zeit wurde das Agar nach Abtropfenlassen des im Sack enthaltenen freien Wassers in ein zuvor abgewogenes, großes Becherglas eingeschüttet und mit soviel destilliertem Wasser aufgefüllt, daß die Menge des letzteren  $\frac{3}{4}$  der zu verwendenden Gesamtmenge ausmachte, sodann in den Dampftopf gestellt und nach erfolgter Auflösung filtriert. Zum klaren Filtrat wurden schließlich die im restlichen Wasser besonders für sich aufgelösten Nährsalze und Glukose hinzugefügt und das Ganze im Dampftopfe sterilisiert. Dieser in größerer Menge zubereitete Agarnährboden wurde alsdann auf kleinere Kolben verteilt, zu denen alsdann in erforderlichen Mengen die verschiedenen Substanzen zugesetzt wurden, deren physiologische Wirkungen auf Azotobacter geprüft werden sollten — und hierauf von neuem im Dampftopf sterilisiert.

Zur Impfung der Kulturen verwendete ich in der Regel Sporenmaterial; waren dieselben in dem Impfmateriale nicht vorhanden und handelte es sich darum, die physiologischen und morphologischen Eigenschaften einer asporogenen Form in den verschiedenen Nährsubstraten zu prüfen, so impfte ich mit diesem Materiale im Vegetationsstadium desselben oder nach Abschluß der Vegetation. Die Impfung geschah durchwegs durch Übertragung einer minimalen Menge des Impfmateriale, und zwar derjenigen Menge, welche durch Eintauchen der Spitze eines Platindrahtes oder Platinöse an derselben haften blieb; nur in solchen Fällen, wo das Impfmateriale einer erst im Anfangsstadium der Entwicklung befindlichen Kultur entnommen wurde, benutzte ich zur Impfung in eine feine Spitze ausgezogene Pipetten, womit ein kleiner Tropfen Kulturflüssigkeit in die neue Kultur eingebracht wurde. Diese Impfmethode hatte zwar den Nachteil, daß die anfängliche Entwicklung unter Umständen sich stark verlangsamte und die Zeitdauer der Versuche mehr oder weniger verlängert werden mußte, brachte aber den für das angestrebte Ziel sehr wichtigen Vorteil, daß die Wirkung der verschiedenen geprüften Substanzen auf die Entwicklung des Azotobacter deutlicher zutage trat und genauer, nament-



lich in morphologischer und cytologischer Beziehung, geprüft und verfolgt werden konnte.

Daß sämtliche Impfungen, Übertragungen, Probenahmen zur mikroskopischen Untersuchung nach den in der modernen Bakteriologie üblichen Grundsätzen und bewährten Methoden ausgeführt wurden, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden. Auch die Zubereitung der Nährböden geschah mit der größtmöglichen Sorgfalt und Genauigkeit; für mehrere Versuche, wo daran gelegen war, kamen umkristallisierte Nährsalze und mit hypermangansaurem Kali versetztes und nochmals abdestilliertes Wasser zur Verwendung. Bei physiologischen Versuchen von prinzipieller Bedeutung, in denen die Wirkung bestimmter Substanzen nicht nur auf die Ernährung und Stickstoffbindung, sondern auch auf die morphologische Gestaltung der Azotobactervegetation geprüft werden sollte, wurden neben den großen Kulturkolben parallel kleinere, mit derselben Nährlösung versetzte und mit demselben Material geimpfte Kulturkolben angesetzt und neben den eigentlichen Versuchskolben gestellt; diese kleinen Kolben dienten zur Entnahme von Proben zur mikroskopischen Untersuchung und Anfertigung von Präparaten, um die Versuchskolben nicht öffnen zu müssen und der Gefahr einer zufälligen Infektion nicht auszusetzen. Im großen und ganzen hatte ich bei meinen Versuchen keine Mißerfolge zu verzeichnen. Schon Vorversuche, bei deren Anstellung übrigens die gleiche Sorgfalt beobachtet wurde, ergaben ein befriedigendes und mit den Hauptversuchen übereinstimmendes Resultat. Auch zufällige Verunreinigungen, wie solche bei Bakterienkulturen unvermeidlich sind, kamen nur äußerst selten und vereinzelt vor, selbst in solchen Kulturen, aus denen zu wiederholten Malen Proben zur mikroskopischen Untersuchung oder anderer Behandlung entnommen wurden. Freilich ist dieses günstige Resultat zum Teil auf die Zusammensetzung der angewandten Nährmedien zurückzuführen, welche für die meisten der gewöhnlichen und verbreitetsten Bakterien keinen günstigen Nährboden bilden.

Die Reinheit der Kulturen wurde durch mikroskopische Untersuchungen, Überimpfungen auf Agarnährboden und Plattengießkulturen kontrolliert.



### III. Morphologie im allgemeinen.

Geschichtliches und Allgemeines. Sämtliche Forscher, welche die morphologische Entwicklung des *Azotobacter chroococcum* studierten, heben die außerordentliche Vielgestaltigkeit und Veränderlichkeit dieser Bakterie hervor. Es wurden schon im einleitenden Kapitel die Hauptformen erwähnt, unter welchen *Azotobacter* laut vorliegenden Beobachtungen auftreten soll; auch habe ich dort auf die zahlreichen Widersprüche hingewiesen, die sich aus den Befunden verschiedener Forscher für die Morphologie des *Azotobacter* ergeben. Während Beijerinck und die meisten seiner Nachfolger kurzgegliederte, einfache oder Doppelstäbchen für die Jugendzustände des *Azotobacter* angeben, hat Hugo Fischer überhaupt keine Stäbchen im normalen Entwicklungsgange des *Azotobacter* beobachtet und ist geneigt anzunehmen, daß Stäbchenformen nur in absterbenden Kulturen als Involutionsformen in Erscheinung treten. Löhnis und Pillai (21) haben ebenfalls in ihrem aus dem Boden der Umgebung von Leipzig isolierten Stamme keine Stäbchenformen beobachtet und erstgenannter Forscher hat sogar in einer späteren, gemeinschaftlich mit Westermann ausgeführten Arbeit (10) auf Grund dieser Eigenschaft diesen seinen Stamm als eine besondere Spezies, *A. vitreum*, vom *A. chroococcum* abgetrennt. Andererseits werden von sämtlichen Forschern kugelige oder Kokkenformen als eine regelmäßige und nie fehlende Erscheinung der morphologischen Entwicklung des *Azotobacter* bezeichnet, woraus geschlossen werden könnte, daß diese Form die Normalform unserer Bakterie darstellt. Aus der Literatur ist weiter zu entnehmen, daß die Kokkenformen anfangs als Einzelkokken oder zumeist als Diplokokken auftreten, in späteren Stadien aber entweder zu *Streptococcus*-artigen Ketten oder zu *Sarcina*-artigen Paketen oder Verbänden von regelmäßiger oder unregelmäßiger Gestalt auswachsen. Nach Beijerinck (1, S. 581), H. Fischer (2, S. 136), Krzemieniewski (14, S. 938) u. a. geht der Ausbildung der *Sarcina*-formen eine starke Verschleimung der Zellmembranen voraus, wodurch die Kokken sich in dicke, durch Methylenblau sichtbar werdende Schleimhüllen einkapseln und in diesem Zustand sich durch Teilungen nach allen drei Richtungen des Raumes vermehren, wodurch eben die *Sarcina*-formen zustande kommen. Aus dieser Darstellung würde sich der Schluß ergeben, daß die mit Schleim-



hüllen umgebenen Kolonien ebenfalls zu den normalen Entwicklungsformen des *Azotobacter* gehören. Beijerinck und Krzemieniewski sprechen sich direkt in diesem Sinne aus, während H. Fischer zwar an einer Stelle sagt, daß „im Streptokokkuszustand die Gallerthülle fast vollständig fehlt“, aber einige Zeilen weiter zu beweisen sucht, wie die in Schleimkapseln eingehüllten Sarcinapakete aus den Streptokokkusketten sich heraus entwickeln. Nach den zuletzt genannten drei Forschern, welche die Morphologie des *Azotobacter* noch am eingehendsten studiert haben, geht die weitere Entwicklung in der Weise vor sich, daß die Sarcinaformen ihrer Schleimhüllen verlustig werden (auf welche Weise, wird nicht gesagt), sich mit einer derberen, durch Einlagerung von braunem Pigment gefärbten und mit Anilinfarbstoffen sich intensiv färbenden Membran umhüllen und so zu Dauerformen werden. H. Fischer bezeichnet dieselben direkt als Sporen und meint, daß die ganze Zelle ohne Abwerfung der Mutterzellmembran zur Spore wird. Nach demselben Forscher keimen die Sporen, in frische Nährlösung gebracht, aus, ohne eine Sporenmembran abzuwerfen. Dagegen hat Krzemieniewski das Ausschlüpfen des *Azotobacter*-Keimlings aus einer Membran direkt beobachtet und durch Zeichnungen und photographische Reproduktion veranschaulicht. Nach diesem Forscher geht die Keimung in der Weise vor sich, daß die Sporenmembran an einem Ende weit gesprengt wird und durch die so entstandene Öffnung der junge Keimling in Form eines kurzen Stäbchens herauswächst, welches sich alsbald durch Teilungen in ebensolche kurzgliederige und zumeist zu Doppelstäbchen vereinigte Stäbchen spaltet. Krzemieniewski erwähnt noch, daß er zu seinen Keimungsversuchen „Material von den braunen, jedoch noch nicht eintrocknenden Kolonien“ entnommen hat, was insofern zu beachten ist, als in diesem Entwicklungszustand noch keine reifen Sporen, sondern nur Vorstufen derselben in den Kolonien anzutreffen sind.

Bezüglich der äußeren makroskopischen Merkmale, welche *Azotobacter*-Vegetationen zuerst in flüssigen Nährböden bieten, stimmen sämtliche Forscher darin überein, daß in Nährlösungen zuerst eine mehr oder weniger starke Trübung bemerkbar wird, worauf sich in 24—48 Stunden auf der Oberfläche eine treibende Haut bildet, welche mit der Zeit immer stärker wird und sich zuletzt in eine dicke, kompakte, schleimige Kahlhaut verwandelt. Diese



Kahmhaut soll für *Azotobacter*-Vegetationen besonders charakteristisch sein und ihre Dicke und Mächtigkeit einen Maßstab für die Kräftigkeit und Üppigkeit seiner Entwicklung abgeben. Auf festem Agarnährboden entwickelt *Azotobacter chroococcum* schleimige, schmutzig weiße, kleisterartige Kolonien, welche rasch an Größe zunehmen und dann eine konzentrische Schichtung nebst radiärer Streifung zeigen; diese in älteren Kolonien regelmäßig auftretenden Zeichnungen sollen nach Krzemieniewski (14, S. 938) mit der Verschleimung der Zellmembranen und Ausbildung der Schleimbüllenkolonien im Zusammenhang stehen. Mit dem Alter der Kolonien und der Ausbildung von *Sarcina*-formen nehmen dieselben eine aschgraue, später eine braune bis schwarzbraune Farbe an, womit die Entwicklung der Kolonien ihren Abschluß erreicht. Doch kommen nicht selten auch Fälle vor, wo die Kolonien sich gar nicht verfärben, wie dies von Löhnis und Westermann und von Omiełński (a. a. O.) beobachtet und als spontane Variation, die sich weiterhin konstant erhält, gedeutet wurde. Beijerinck (12) hat ebenfalls eine solche Variation beobachtet, und zwar innerhalb einer einzelnen Kolonie, welche dann „ein scheckiges, aus dunklen und weißen Streifen zusammengesetztes Bild bietet“.

Faßt man das Fazit unserer Kenntnisse über die Morphologie des *A. chroococcum* zusammen, so kommt man auf Grund derzeitiger Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die Kugel- oder Kokkusform die eigentliche Grund- oder Normalform unserer Bakterie ist, indem dieselbe in allen möglichen Variationen (als Einzel-, Diplo- und Streptokokken, ferner als *Micrococcus* und *Sarcina*) regelmäßig und ausnahmslos in die Erscheinung tritt, während die Stäbchenform nur in den allerersten Stadien der Entwicklung und selbst in diesen Stadien nicht immer beobachtet wird; letztere müßte demnach bloß als eine unter besonderen Umständen auftretende Variation der normalen Kokkusform aufzufassen sein. Ich werde weiter unten in dieser Arbeit beweisen, daß gerade das Entgegengesetzte der Fall ist, in dem Sinne nämlich, daß bei normaler und üppiger Entwicklung die Stäbchenform die vorherrschende ist, gegen welche die erst im späteren Lebensstadium auftretende Kokkusform sehr stark zurücktritt. Es wird sich weiterhin auch zeigen, daß die in der Wissenschaft zur Zeit herrschenden Ansichten über die Schwärmfähigkeit und Begeißelung unserer



Bakterie sowie über die Erscheinungen der Kahlhautbildung zum Teil auf falschen Voraussetzungen, zum andern Teil auf unzureichenden oder irrigen Beobachtungen beruht.

Bevor ich jedoch auf dieses Thema eingehe, scheint es mir notwendig zu sein, einige Worte darüber zu verlieren, was wir unter einer normalen Entwicklung der Bakterien zu verstehen haben. Die Frage ist — meines Erachtens — leicht zu beantworten. Bei den hoch organisierten Pflanzen und Tieren überwiegt im Individualleben des Organismus der vegetative Zustand der Ernährung und des Wachstums über den fruktifikativen der Vermehrung und Zeugung, welcher erst in einem späteren, als Reife bezeichneten Lebensstadium erreicht wird und oft, wenn auch nicht immer, den Abschluß des Individuallebens bildet. Ähnliches beobachten wir bei den niedrig organisierten, aber noch aus mehr oder weniger zahlreichen Zellkomplexen bestehenden Organismen. Bei den einzelligen Organismen, zu welchen die Bakterien gehören, sind die vegetativen und fruktifikativen Zustände des Lebens auf eine einzelne Zelle beschränkt, welche sich ernährt und durch Wachstum vergrößert, dann aber durch Teilung in neue Individuen spaltet; diese Art der Vermehrung wird jedoch als vegetative Vermehrung von der im späteren Alter auftretenden fruktifikativen Zeugung, bei welcher Ernährung und Wachstum der Zellen entweder ganz aufhören oder wenigstens stark zurücktreten und besondere Fruktifikationsorgane (Sporen) ausgebildet werden, unterschieden. Wendet man diesen normalen Entwicklungsgang der Bakterien auf *Azotobacter* an, so kann nur diejenige Entwicklung unseres Mikroben als normal bezeichnet werden, bei welcher die vegetativen Lebensformen über die fruktifikativen überwiegen; findet das Gegenteil statt und gehen die Zellen schon in den Anfangsstadien des Lebens in Fruktifikation über, so ist anzunehmen, wie dies auch in ähnlichen Fällen für andere Bakterien geschieht, daß irgend welche ungünstige Einflüsse die normale Entwicklung hemmen und die Erscheinungen der frühen Reife und beschleunigten Sporulation herbeiführen.

Von diesem Gesichtspunkte aus werde ich mich in der nachfolgenden Darstellung der morphologischen Entwicklung des *A. chroococcum* leiten lassen. Ich werde zuerst die Morphologie des *Azotobacter* im allgemeinen nach den äußeren Merkmalen der Vegetationsbilder, welche unter dem Wechsel verschiedener Agenzien



zustande kommen, zur Darstellung bringen und dann im speziellen Teil die vegetativen und Fruktifikationsformen, die Sporenbildung und Sporenkeimung und zum Schluß die sogenannten Involutions- und Regenerationsformen eingehend behandeln. An diese Darstellung werden sich naturgemäß die cytologischen Begleiterscheinungen, welche mit der morphologischen Gestaltung Hand in Hand gehen und letztere wesentlich beeinflussen, anreihen; praktische Rücksichten bestimmen mich jedoch, die cytologischen Lebenserscheinungen im morphologischen Teile auf das Notwendigste zu beschränken, um dieselben in einem weiteren Abschnitt ausführlich und einheitlich zur Sprache zu bringen. Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die biologischen Fragen der Variation und Rassenbildung, der Einheit oder Verschiedenheit der Arten, dann die Physiologie der Ernährung insbesondere mit bezug auf die Stickstoffbindungsfähigkeit und die Kräfte, durch welche diese Fähigkeit erlangt wird, und zum Schluß allgemeine Betrachtungen über die Stellung des *Azotobacter* im System und andere Probleme allgemeiner Natur zur Erörterung gelangen.

#### Methodik der morphologischen Untersuchungen.

Die Morphologie des *Az. chroococcum* wurde sowohl in gewöhnlichen Kulturen in Nährlösungen und auf festem Nährboden, als auch insbesondere in Tropfenkulturen in der feuchten Kammer direkt unter dem Mikroskop verfolgt. Die Kulturen im großen, welche mit den im II. Kapitel angegebenen Nährmedien und mit den weiter unten zu erwähnenden Zusätzen angestellt wurden, hatten den Zweck, über die Veränderlichkeit der Gestaltung unter dem Einfluß von verschiedenen Agenzien und über das Ausmaß und die Grenzen dieser Veränderlichkeit Aufschluß zu geben. Die eigentlichen morphologischen Studien, durch welche die einzelnen Phasen der Entwicklung in ihrem Zusammenhange und ihrer Aufeinanderfolge lückenlos erschlossen werden sollten und erschlossen wurden, sind in Tropfenkulturen durchgeführt worden. Gewöhnlich ging einer jeden Tropfenkultur eine in kleinen Erlenmeyerkolben mit der gleichen Nährlösung angestellte, gewöhnliche Kultur voran, welcher von Zeit zu Zeit Proben zur orientierenden mikroskopischen Untersuchung entnommen wurden. In anderen Fällen, wo die Anlegung solcher Vorkulturen unterblieb, wurden wenigstens



die zur Herstellung von Tropfenkulturen benutzten Uhrgläser mit den beimpften Nährlösungen unmittelbar darauf in eine feucht gehaltene und vor Verdunstung geschützte Glasschale gelegt und mit dieser in den Thermostaten gestellt, um die sich hier entwickelnde Vegetation mit derjenigen der Tropfenkultur in Vergleich ziehen zu können. Handelte es sich darum, die morphologischen und cytologischen Details der direkten mikroskopischen Beobachtung durch Färbemethoden oder mikrochemische Reaktionen zu überprüfen, so wurde die Kultur in der feuchten Kammer im entsprechenden Moment abgebrochen und die ganze Kultur zu Tinktionen u. dgl. verwendet. Selbstverständlich wurden auch Präparate aus den Parallelkulturen mit denselben Färbungsmethoden angefertigt, doch lieferten solche Präparate im allgemeinen weniger instruktive Bilder schon aus dem einfachen Grunde, weil in solchen Kulturen die geprüften Entwicklungsstadien nicht immer in der erforderlichen Zahl und Ausbildung vorhanden waren.

Als Impfmateriale habe ich zumeist Sporen aus Agarkulturen verschiedenen Alters, später auch vegetative, fruktifikative und Involutionsformen für die Tropfenkulturen benutzt. Die mit Sporen besäten Kulturen bieten den Vorteil, daß — günstige Bedingungen vorausgesetzt — die ganze Entwicklung von Spore zu Spore in einem Versuche verfolgt und erschlossen werden kann; da jedoch Sporen in der feuchten Kammer nicht immer oder erst nach vielen Stunden auskeimen, so sind Mißerfolge mit Sporenmaterial viel häufiger, als bei Verwendung von entwicklungsfähigen, vegetativen oder fruktifikativen Zuständen, die sich auch an etwaige neue Nährmedien leichter und schneller anpassen.

Um anderen Forschern die Nachprüfung der im Nachstehenden mitgeteilten Ergebnisse zu erleichtern, will ich noch kurz über die von mir befolgte Methode der Tropfenkulturen berichten. Nach vielen mit verschiedenen Systemen von feuchten Kammern fehlgeschlagenen Versuchen, den Azotobacter zu einer normalen und gedeihlichen Entwicklung zu bringen, haben sich schließlich die gewöhnlichen, mit einer kreisförmig hohlgeschliffenen Vertiefung versehenen Objektträger für diese Zwecke am brauchbarsten erwiesen. Eine Hauptbedingung des Gelingens der Kultur ist aber, daß der Verschluß des Deckgläschens nach außen nicht mit Vaseline oder Fettsubstanz bewerkstelligt wird, sondern mit einem Verschlusmittel, welches weniger dicht abschließt und einen Austausch



der Gase zwischen der äußeren Atmosphäre und dem Innern der feuchten Kammer gestattet. Ich verwendete zu diesem Zwecke Wachs und legte stets gleichzeitig mehrere Kulturen an. Ist der Wachsverschluß zu dicht, so findet nur eine beschränkte Entwicklung statt und die Kultur stirbt bald ab; ist er zu locker, dann verdunstet der Tropfen nach mehreren Stunden und die Entwicklung bleibt gänzlich aus. Legt man aber mehrere Kulturen gleichzeitig an, so finden sich darunter stets eine bis einige, bei denen die erwünschte Dichtigkeit des Verschlusses erzielt wurde. Nach einiger Zeit kommt man durch Übung dazu, daß man den Wachsüberzug genau so bemißt, daß alle oder die Mehrzahl der Kulturen gelingen.

#### Morphologische Vegetationsbilder.

Die außerordentliche Variabilität des *Azotobacter chroococcum*, die wohl nur ein Ausdruck seiner großen Anpassungsfähigkeit an die wechselnden Lebensbedingungen in der Natur ist, gibt sich vor allem in den mannigfaltigen Gestaltungen seiner Lebensformen und in dem äußeren Bild seiner Vegetationen in den verschiedenen Nährmedien kund. Aus diesem Grunde scheint es mir nützlich zu sein, vor Eingehen auf die Details der morphologischen Entwicklung ein gedrängtes und anschauliches Bild über die makro- und mikroskopischen Erscheinungen, welche die Azotobacter-Vegetationen in den von mir angewandten Nährmedien bieten, zu geben; dadurch wird, wie ich glaube, manches von dem, was weiter unten auseinandergesetzt werden soll, dem Verständnis näher gebracht und manchen Weitläufigkeiten und Wiederholungen vorgebeugt.

Ich beginne mit der von den meisten Forschern für Azotobacterkulturen angewandten Beijerinck'schen Mannitlösung im Leitungswasser. Obgleich das hiesige Leitungswasser sehr kalk- und eisenhaltig ist, was von Belang ist, wie ich es im zweiten Teile dieser Arbeit näher begründen will, ist doch das Wachstum des Azotobacter in solchen Nährlösungen ein recht kümmerliches: die Flüssigkeit trübt sich nur schwach, auf der Oberfläche bildet sich ein feines Häutchen, daß sich mit der Zeit wohl etwas verstärkt, doch selbst bei schwacher Erschütterung sich von den Gefäßwänden löst und zu Boden sinkt. Die mikroskopische Untersuchung lehrt, daß die Vegetation in den ersten 24—30 Stunden aus kurzgliedri-



gen, an den Enden abgerundeten, fast kokkenartigen Stäbchen besteht, die meistens ganz unbeweglich sind oder vereinzelt schwache Schwärmversuche machen, sich bald an der Oberfläche der Nährlösung zu schwach schleimigen Kolonien ansammeln und hier Vegetationsbilder geben, wie solche von den meisten Forschern (Bejerinck (1) T. I, Fig. 1, H. Fischer (2), T. 2, Fig. 1, Krzymieniewski (14), T. XXXI, Fig. 5) in Photogrammen reproduziert wurden. In den Oberflächenkolonien verwandeln sich die Kurzstäbchen alsbald in Kokken, die sich mit zahlreichen Körnchen von verschiedener Größe und verschiedenem Lichtbrechungsvermögen erfüllen und, insoweit sie auf der Oberfläche verbleiben und der direkten Luftwirkung ausgesetzt sind, sich zum Teil mit dickeren und sich bräunenden Membranen umhüllen und in Sporen verwandeln, zum anderen Teil bestimmte Degenerationserscheinungen erleiden, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann. Sinken die Kolonien zu Boden, so bleibt die Sporenbildung ganz aus und es treten abnorme Wuchsformen und Degenerationserscheinungen in erhöhtem Grade auf; doch bleibt das Leben und die Möglichkeit des Wiedererwachens zum neuen Leben und Wachstum solcher absterbenden Kulturen, wie Impfversuche beweisen, noch durch Monate erhalten. Ein gleiches oder ähnliches Bild erhält man, wenn statt Mannit Glukose oder die von mir angewendete Grundnährlösung mit Glukose und sämtlichen mineralischen Nährstoffen, deren Zusammensetzung auf S. 102 angegeben ist, zur Kultur verwendet wird. Werden jedoch dieselben Kulturen nicht in Ruhe gehalten, sondern von Zeit zu Zeit geschüttelt und wird auf diese primitive Weise für eine reichlichere Aeration der Nährlösung gesorgt<sup>1)</sup>, so wird im großen und ganzen dadurch das äußere Bild der Vegetation zwar nicht prinzipiell geändert, aber es treten doch Veränderungen ein, die der Beachtung wert sind. Makroskopisch gibt sich der Einfluß der stärkeren Aeration vor allem durch stärkere Trübung der Flüssigkeit und Ausbleiben des Oberflächenhäutchens kund; beides kann jedoch und muß — wenigstens zum Teil — auf die mechanische Wirkung des Schüttelns zurückgeführt

<sup>1)</sup> Mangels eines Apparats zur kontinuierlichen Durchleitung der Luft durch Nährlösungen konnten die Versuche über den Einfluß der Aeration auf die Entwicklung des Azotobacter in exakter Weise zur Zeit noch nicht durchgeführt werden; sie sollen jedoch in nächster Zeit in Angriff genommen werden.



werden. Mikroskopisch findet man in geschüttelten Kulturen von Anfang an eine größere Anzahl von Stäbchenformen, die mehrmals länger als breit sind und durch ihre äußere Form und Beweglichkeit besonders auffallen; gegen diese Formen treten die Kurzstäbchen und die Kokkenformen, namentlich in den ersten paar Tagen, stark zurück. Das reichliche Auftreten von Langstäbchen, die zumeist, wenn auch nicht immer, lebhaft umherschwärmen, kann augenscheinlich nicht mehr auf die mechanische Wirkung des Schüttelns bezogen werden, muß vielmehr durch reichlichere Luftzufuhr und intensiveren Austausch der Gase zwischen der Nährflüssigkeit und der umgebenden Atmosphäre bedingt werden. Die mechanischen Wirkungen des Schüttelns geben sich dafür in anderer Weise kund: es treten in den Kulturen zahlreiche abgestorbene Individuen, besonders von Langstäbchen, auf und es erscheinen daneben zahlreiche winzige Azotobacterzellen in Stäbchen- und Kokkenform, die in Gestalt und Struktur vollständig mit den gewöhnlichen oder Normalformen übereinstimmen, aber kaum die Hälfte oder ein Drittel der Größe der Normalformen erreichen. Über diese letzteren beachtenswerten Erscheinungen will ich weiter unten an passender Stelle noch ausführlich handeln.

Ein ganz anderes Bild bieten die Azotobacterkulturen, wenn man zu denselben Nährlösungen geringe Mengen von gewissen Stoffen zusetzt, von denen anzunehmen ist, daß sie keine für unser Mikrobium unentbehrlichen Nährstoffe (für deren Zufuhr übrigens in den in Frage kommenden Nährlösungen reichlich vorgesorgt worden ist) oder wenigstens in erfahrungsgemäß nicht aufnehmbarer Form oder schließlich in kaum in Betracht kommenden Mengen enthalten. Als solche Zusatzstoffe habe ich zur Zeit folgende Substanzen kolloider und kristalloider Natur verwendet, und zwar von Kolloiden: humussaures Natrium, Eisenhydroxyd in reiner, auf dialytischem Wege gewonnener Wasser- und dasselbe in Rohrzuckerlösung, Aluminiumhydroxyd und Orthokieselsäure, dialysiert; von nicht kolloiden Stoffen organischer Herkunft fein gemahlene Holzkohle und Knochenkohle und von solchen mineralischen Ursprungs kohlen-sauren Kalk und kohlen-saure Magnesia. Alle diese Stoffe kamen entweder für sich allein oder in Kombination miteinander in Anwendung, hauptsächlich zu dem Zwecke, um Antwort auf gewisse physiologische Fragen, die sich im Laufe dieser Untersuchungen ergaben, auf diesem Wege zu erlangen. In mor-



phologischer Hinsicht führten die mit obigen Zusatzstoffen ange-  
stellten Kulturen zu folgenden Resultaten.

1) Humussaures Natrium<sup>1)</sup>. Menge 0·50—1·25 g per Liter Nährlösung. Eine starke und üppige Vegetation von lebhaft beweglichen, kräftigen Langstäbchen, die schon am zweiten Tage beginnt und durch die folgenden 3—5 Tage fast ungeschwächt andauert. Trübung wegen der dunklen Färbung der Nährflüssigkeit nicht wahrnehmbar; anfänglich keine Kahlhaut und keine bemerkbaren Schleimkolonien an der Oberfläche und an den Wänden des Kulturkolbens; diese erscheinen erst nach 3 Tagen als dicke, weißliche Belege längs der Gefäßwände und bilden am Rande der Flüssigkeit einen weißlichen Ring von verschiedener Mächtigkeit; dann tritt auch eine schwache Kahlhaut zum Vorschein. Vom dritten Tage an treten zuerst vereinzelt, später in immer größerer Anzahl Diplo- und Einzelkokken auf, die sich zu immer größeren Haufen an der Oberfläche und am Boden des Gefäßes ansammeln, mit derberen, sich braun verfärbenden Membranen umgeben und zu Sporen werden. Die Kokkusformen ohne Schleimkapseln, überhaupt keine algenartigen Gallertkolonien; diese erscheinen erst nach Abschluß der Hauptvegetation (nach 6—8 Tagen) in spärlicher Zahl an der Oberfläche der Nährlösung und können hier noch nach Wochen gefunden werden. Stäbchenformen selbst zur Zeit der Fruktifikation noch in großen Mengen vorhanden, aber meist unbeweglich oder wenn noch beweglich, dann mit anderen Zellstrukturen.

2) Humussaures Natrium + kohlensaurer Kalk. Menge für ersteres, wie ad 1), für letzteren 3·0—5·0—10 g per Liter Nährlösung. Anfängliche Entwicklung, wie sub 1), doch sind die Stäbchen vorwiegend kürzer, oval, weniger beweglich und gehen alsbald in Kokkusformen über. An der Oberfläche der Flüssigkeit und an den Gefäßwänden sammeln sich schleimige Kolonien an, die bald zu einer dicken, mehr oder weniger geschlossenen und gefalteten Kahlhaut zusammenfließen. Am Boden des Kulturgefäßes

<sup>1)</sup> Zu diesen Versuchen wurde das im hiesigen agrikulturnchemischen Institut von Krzemieniewski im Jahre 1907 dargestellte „Natriumhumat aus Garten-erde“ (sehr humusreiche Rasenerde des Universitätsgärtchens) verwendet, welches nach den Versuchsergebnissen dieses Forschers physiologisch sich als wenig wirksam erwies. Die Wirksamkeit dieses Humats ließ sich jedoch durch Zusatz von minimalen Mengen Eisenhydroxyd in Sakcharoselösung, kohlensaurem Kalk, kohlensaurer Magnesia und Kieselsäure bedeutend steigern.



und in der oberflächlichen Kahmhaut zahlreiche Kokkenkolonien in Schleimkapseln von mäßiger Dicke. Sporenbildung fast ausschließlich in den der Luftwirkung unmittelbar ausgesetzten Oberflächenkolonien. Das von Krzemieniewski dargestellte (s. obige Anmerk.) und durch Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  u. s. w. nicht gekräftigte, demnach „wenig wirksame“ Natriumhumat gab eine ähnliche Vegetation, doch waren die vegetativen Stäbchenformen noch mehr kokkenähnlich und zur Bildung von schleimigen Oberflächen- und Wandkolonien geneigt.

3) Eisenhydroxyd in reiner, dialysierter Wasserlösung. Menge 37·5—90 mg  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  per Liter Nährlösung. Keine fördernde, vielmehr eine hemmende Wirkung. Vegetation schwächer als in reiner Nährlösung.

4) Aluminiumhydroxyd in dialysierter Wasserauflösung. Menge: 40—0·60 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  per Liter Nährlösung. Die Nährlösung hält sich wochenlang klar, keine Entwicklung, demnach direkt schädliche Wirkung.

5) Eisenhydroxyd in Rohrzuckerlösung. Menge 37·5—90 mg  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  per Liter Nährlösung. Bei starker Trübung der Nährlösung eine reichliche Vegetation von beweglichen, zylindrischen Langstäbchen, die jedoch bald in kurzgliedrige, oval oder verlängert halbkugelige Kurzstäbchen und dann in sporulierende Kokken übergehen. In der Tiefe der Nährlösung umhüllen sich diese Kokken mit mächtigen und zuweilen so dichten Schleimhüllen, daß dieselben selbst ohne Färbungsmittel gut sichtbar und scharf umgrenzt sind. Die Schleimkolonien sammeln sich später an der Oberfläche der Flüssigkeit, wo sie zu einer zusammenhängenden, mehr oder weniger dicken Kahmhaut zusammenfließen, in welcher nach Auflösung der Schleimhüllen und Ausbildung einer derben, sich braun bis schwarz verfärbenden Membran Sporulation eintritt. Schütteln der Kulturen verhindert die Ausbildung der Schleimkolonien, verlängert die Dauer der vegetativen Stäbchenformen, verursacht jedoch gleichzeitig das Erscheinen zahlreicher Involutions- und der kleinzelligen Mikroazotobacterformen.

6) Eisenhydroxyd in Rohrzuckerlösung + kohlen-saurer Kalk. Menge des ersteren, wie sub 5), des letzteren 2·5—5·0—10·0 g per Liter Nährlösung. Anfängliche Entwicklung, wie sub 5), doch ist die Vegetation üppiger, mit vorherrschenden, zu-meist lebhaft beweglichen Langstäbchen, die längere Zeit anhalten,



bevor sie in Kokkenformen übergehen. Kolonien in Schleimkapseln kommen nur sporadisch und schwach entwickelt vor, dafür wachsen die Stäbchen zu langen, kettenförmigen Fäden aus, deren Glieder ovoid anschwellen und sich mit derberen, doppelt konturierten Membranen umgeben. Sporenbildung verzögert und unregelmäßig verlaufend.

7) Orthokieselsäure (aus Natriumsilikatlösung mit verdünnter HCl-Säure dargestellt). Menge 60—90 mg per Liter Nährlösung. Ziemlich schwache Trübung mit anfangs beweglichen, später zur Ruhe kommenden Langstäbchen, die sich bald in Kurzstäbchen und Kokken umwandeln. Kolonien in Schleimhüllen wenig und schwach entwickelt; Sporenbildung unregelmäßig.

8) Kohlensaurer Kalk für sich allein. Menge: 2·5—5·0—10·0 g per Liter Nährlösung. Ziemlich starke Trübung mit anfänglich am Boden des Gefäßes sich bildenden, sarcinaartigen Kolonien mit kompakten, aber ziemlich schwach entwickelten Schleimhüllen. Die Stäbchenformen, von sehr kurzer Dauer und schwach beweglich, gehen bald in das Stadium der fruktifikativen Doppelkokken über, die sich mit Schleimhüllen umgeben, an der Oberfläche der Flüssigkeit ansammeln und zur Bildung einer dicken, schleimigen und mit der Zeit sich braun bis schwarz verfärbenden Kahlhaut Veranlassung geben. Sporenbildung sehr ergiebig; doch viele Sporen abortiv.

9) Holzkohle, bzw. Knochenkohle (feinst gepulvert). Menge: 1·5—2·0—3·0 per Liter Nährlösung. Anfängliche Entwicklung, wie sub 1) aus zahlreichen, lebhaft beweglichen, kräftigen Langstäbchen bestehend, die jedoch bald zur Ruhe kommen und zu schleimigen, mehr oder weniger ausgebreiteten, weißlichen, oberflächlichen Kahlhäuten sich vereinigen. Letztere bestehen anfangs aus kettenförmig gegliederten, langen und vielfach gewundenen Fäden, die zumeist keine deutliche Segmentierung zeigen und deren einzelne Glieder in der Mitte geschwollen und spindelförmig erscheinen. Ein Teil dieser Fäden geht in sporulierende Kokken über, ein anderer degeneriert und stirbt ab. Am Boden des Gefäßes sind vom dritten Tage an, namentlich in Nährlösungen mit Zusatz von Holzkohle (Buchen- und Lindenkohle) in Schleimhüllen eingebettete, sarcina- oder kugelförmige Kolonien stets zu finden. In Nährlösungen mit Knochenkohle kommen letztere nur vereinzelt vor und überhaupt ist die Entwicklung bei Zusatz von Knochenkohle nicht nur reich-



licher, sondern auch im ganzen Verlaufe der normalen mehr genähert.

10) Holzkohle + Eisenhydroxyd in Zuckerlösung +  $\text{CaCO}_3$ . Menge der ersteren wie sub 9), des zweiten wie sub 5), des dritten 10.0 g per Liter. Sehr starke Trübung mit anfangs beweglichen, später unbeweglichen und in Kokkenformen bald übergehenden Langstäbchen; reichliche Kahlhautbildung, doch fehlen in Schleimhüllen eingebettete Sarcina- oder Kugelkolonien sowohl in der Tiefe, wie auch an der Oberfläche; reichliche Sporulation mit zumeist normal ausgebildeten Sporen.

Ich beschränke mich auf diese wenigen Beispiele von Vegetationsbildern, welche durch Zusatz von geringen Mengen verschiedener Stoffe für sich allein und in Kombination zu einer und derselben Glukosenährlösung mit den erforderlichen Nährsalzen hervorgebracht werden. Selbstverständlich kommen je nach der Menge der angewandten Zusätze und je nach den sonstigen Kulturbedingungen (Temperatur, Mächtigkeit der Flüssigkeitsschicht u. s. w.) gewisse Abweichungen von dem geschilderten Typus vor, die jedoch das allgemeine Charakterbild der Vegetation nicht ändern. Bezüglich der übrigen in Anwendung gebrachten Kombinationen und der physiologischen Wirkungen der einzelnen Stoffe für sich allein und in Kombination mit anderen Stoffen auf die Stickstoffbindung bei Azotobacter muß auf den zweiten Teil dieser Abhandlung verwiesen werden. Hier mag nur erwähnt werden, daß es mir bis jetzt nicht gelungen ist, eine solche Kombination von sonstigen mineralischen oder organischen Zusatzstoffen herzustellen, welche die Wirkungen eines voll wirksamen natürlichen Humats<sup>1)</sup> voll ersetzen könnte; ich zweifle jedoch nicht, daß diese Kombination gefunden werden wird, da die verschiedenen sogen. natürlichen Humate nach den übereinstimmenden Versuchen von Krzemieniewski und Th. Remy in ihrer Wirkungsweise stark variieren, und das zu meinen Versuchen verwendete „Natriumhumat aus Gartenerde“ für sich allein, wie oben schon erwähnt wurde, nicht besser wirkte, als Eisenoxyd in Zuckerlösung + kieselsaures Natrium +  $\text{CaCO}_3$ .

In ähnlicher Weise wirkten die verschiedenen Zusatzstoffe zum

<sup>1)</sup> Richtiger wäre zu sagen: „eines aus humusreicher Erde durch Extraktion mit verdünnten Alkalilösungen gewonnenen und voll wirksamen Humats“.



festen Agarnährboden auf die Entwicklung im allgemeinen und auf die Ausbildung bestimmter morphologischer Gestalten im besonderen fördernd oder hemmend; doch traten diese Wirkungen gegen die in Nährlösungen beobachteten bedeutend zurück. So konnte bei Zusatz von Natriumhumat nicht nur ein stärkeres Wachstum und ein stärkerer Kolonienbelag, sondern auch eine längere Dauer der Vegetation mit Vorherrschen der vegetativen Stäbchenformen konstatiert werden; dagegen wirkten Eisenhydroxyd, Natriumsilikat und kohlensaurer Kalk für sich allein und in Kombination miteinander beschleunigend auf die Fruktifikationserscheinungen und fördernd auf die Anhäufung des braunen Pigments in den Sporenmembranen. Nicht minder war die Wirkung dieser Zusatzstoffe auf die Ausbildung der Schleimhüllen unverkennbar, obgleich sie nicht in dem Maße zutage trat, wie in Nährlösungen, welcher Umstand wohl durch das Oberflächenwachstum der Kolonien und die ungehinderte Aeration erklärt werden kann.

Die Ergebnisse aller dieser biologisch-morphologischen Versuche bestätigen zuerst die große Variabilität und Anpassungsfähigkeit des *Azotobacter*mikroben an die äußeren Bedingungen des Lebens. In morphologischer Beziehung sind sie insoweit interessant und wichtig, als sie dartun, daß gewisse morphologische Zustände durch Einwirkung bestimmter Stoffe vollständig oder fast vollständig unterdrückt, andere Zustände wieder begünstigt oder direkt hervorgebracht werden können. Sie beweisen schließlich, daß die Lebensgeschichte des *Az. chroococcum* bis in die letzte Zeit infolge fehlerhafter Versuchsmethoden und unzureichender Beobachtungen nur zu einem geringeren Teil erschlossen war und daß ein großer und wichtiger Lebensabschnitt, derjenige der vegetativen Ernährung und Vermehrung, übersehen wurde und fast unbekannt geblieben ist. Diese Lücke in unseren Kenntnissen der Lebensgeschichte des *Azotobacter* ist unstreitig eine der Hauptursachen gewesen, daß so zahlreiche Forscher bei ihren Versuchen trotz allen Scharfsinns und angewandter Mühe auf Irrwege gerieten oder wenigstens die richtig beobachteten Erscheinungen und Tatsachen ganz falsch deuteten.

Indem ich hiemit diesen Abschnitt über die allgemeine Morphologie des *Az. chroococcum* abschließe, gehe ich zur Schilderung seines morphologischen Entwicklungsganges in den einzelnen Lebensphasen über.



#### IV. Spezielle Morphologie und Cytologie im allgemeinen.

Da die morphologischen Lebenserscheinungen bei den einzelligen Organismen von den cytologischen Vorgängen in der Zelle selbst nicht gut abgetrennt werden können, so soll in diesem Kapitel auch das Notwendigste aus der Cytologie des Azotobacter mitberücksichtigt werden; der Wichtigkeit des Gegenstandes halber und mit Rücksicht auf die Fülle von Erscheinungen und Problemen, die mit der Cytologie der Bakterien verknüpft sind, soll jedoch den cytologischen Lebenserscheinungen das nächste Kapitel gewidmet werden.

Aus den im letzten Abschnitte mitgeteilten Beobachtungen ergibt sich ohne weiteres, daß im morphologischen Entwicklungszyklus des Azotobacter drei morphologisch differente Lebensformen unterschieden werden können:

1) Normale Lebensformen, welche unter günstigen Lebensbedingungen, die zugleich als normal angesprochen werden können, zustande kommen und durch das Vorherrschen, bezw. Überwiegen der vegetativen Lebenszustände über die fruktifikativen charakterisiert sind.

2) Anpassungsformen. Diese sind als biologische und physiologische Reaktionen des lebenden Organismus, die ihren Ausdruck auch in der morphologischen Gestaltung des Zelleibes finden, auf bestimmte, in ungünstiger Weise wirkende äußere Reize aufzufassen, gegen welche der Organismus sich zu wehren sucht. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht immer, sondern nur zeitweilig auftreten, solange nämlich die sie bewirkenden Ursachen andauern, sie gehen auch mit dem Aufhören dieser Ursachen in die normalen Lebensformen, oder bei längerem Andauern in die:

3) Involutionsformen über, welche mit der Abschwächung der Lebensenergie und Störungen in den normalen Lebensprozessen beginnen und je nach dem Grad dieser Abschwächung und der erlittenen Strukturveränderungen bei Wiedereintritt günstigerer Lebensbedingungen entweder in eine der erstgenannten Lebensformen umschlagen, oder nicht mehr lebensfähig sind und dem Zerfall anheimfallen.

Zu diesen drei Lebensformen unseres Mikroben, die ich schon in meiner ersten, vorläufigen Mitteilung in der Sitzung vom 4. Dezember 1911 der mathem.-naturwiss. Klasse der Akademie der Wis-



senschaften unterschieden habe (22, 23) kommt noch eine neue Kategorie von Lebensformen hinzu, welche ich als:

4) **Regenerationsformen** bezeichne. Diese nur unter ungünstigen Bedingungen und aus den absterbenden Zellen sich entwickelnden Lebensformen entstehen dadurch, daß Teile der lebendigen Leibessubstanz aus der absterbenden Zelle entweder nach außen ausgestoßen werden oder sich auch im Innern derselben zu neuen Individuen und neuen Generationen weiter entwickeln.

So verschieden aber die morphologischen Gestaltungsformen des *Azotobacter* sein können, lassen sich doch sämtliche Lebensformen auf zwei Haupt- oder Grundformen zurückführen. Diese Grundformen sind:

1) die *Bacterium*- oder Stäbchenform, welche die Jugendzustände der vegetativen Propagation charakterisiert — und

2) die *Coccus*- oder Kugelform, welche dem reiferen Alter und dem fruktifikativen Lebensstadium eigentümlich ist. Letztere Form entwickelt sich immer aus der ersteren und geht nach Absolvierung des Ruhe- bzw. Sporenstadiums wieder in die erstere über.

Wir haben demnach, um den ganzen Entwicklungszyklus des *Azotobacter* mit allen seinen Abweichungen und Modifikationen kennen zu lernen, folgende Entwicklungsphasen und Lebenserscheinungen ins Auge zu fassen: 1) die vegetativen und fruktifikativen Formen mit den ihnen eigenen Anpassungsformen und Schwärmerzuständen; 2) die Sporenbildung und die Sporenkeimung; 3) die Involutionsformen und 4) die Regenerationsformen.

Die vegetativen Formen. Unter den vielen Eigentümlichkeiten, welche die Morphologie und Biologie des *Az. chroococcum* bietet, ist in vielfacher Beziehung die Erscheinung beachtenswert, daß seine vegetativen Lebensformen, wie dies bei anderen Stäbchenbakterien der Fall ist, nicht direkt aus der keimenden Spore hervorgehen, vielmehr erst später zur Ausbildung gelangen. In der Regel geschieht dies, wenn wir den aus der Spore herauschlüpfenden Keimling als erste Generation betrachten, in der dritten Generation. Dieser eigentümliche Entwicklungsmodus, über dessen Entstehung und Ursachen bei dem heutigen Stande der Bakterienkunde nichts Positives gesagt werden kann, erklärt uns jedoch die Tatsache, daß so viele scharfsinnige Forscher die vegetativen Lebenszustände des *Azotobacter* gar nicht gesehen oder wenigstens übersehen haben. Diese Formen sind nämlich an bestimmte Ernährungs-



bedingungen gebunden und stehen, wie dies im zweiten Teil dieser Arbeit bewiesen werden soll, mit dem Stickstoffbindungsvermögen des Azotobacter im innigen, kausalen Zusammenhange. Sind nun die Bedingungen zu einer ausgiebigen Assimilation des freien Stickstoffs nicht vorhanden, so werden die vegetativen Lebensformen nur vorübergehend und auf kurze Zeit oder auch gar nicht entwickelt; im letzteren Falle behalten seine Zellen diejenige Form, in welcher sie aus der Spore herausgekeimt waren; es findet dann aber nur ein kümmerliches Wachstum und keine oder wohl nur eine sehr beschränkte Fixation des Luftstickstoffs statt. Unter entgegengesetzten Verhältnissen, also bei Gegenwart solcher Stoffe, welche dem Azotobacter die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs ermöglichen, findet umgekehrt eine sehr ausgiebige Entwicklung der vegetativen Lebensformen statt, wobei auch der Fall eintreten kann, daß überhaupt keine anderen Formen oder nur in beschränkter Anzahl gebildet werden, wodann die Vegetation nach Verbrauch der disponiblen Kohlenstoffnahrung fast ausschließlich oder doch überwiegend aus vegetativen Formen besteht und in diesem Zustande sich Wochen und Monate lang erhält.

Die jungen Stäbchen, welche sich aus den Keimlingskokken (22, S. 515) entwickeln, haben die Form von zylindrischen Stäbchen, welche zuweilen an den freien Enden fast abgestutzt, gewöhnlich aber ein wenig verschmälert und schwach abgerundet sind (Taf. VII, Fig. 1 und 2); sie erhalten dadurch eine langgezogene zylindrische oder ovoide Gestalt. Ihre Dimensionen wechseln je nach dem Substrat, den Ernährungsbedingungen und dem Teilungsstadium, in welchem sie sich befinden; im allgemeinen sind sie in der Regel 3—4-mal so lang als breit. Ihre Länge beträgt 9—12  $\mu$  und mehr, ihre Breite 3—4  $\mu$ . Im Stadium der Spaltung in zwei Tochterindividuen sind sie am kürzesten und erreichen ihre größte Länge in der Zeit, wo die Scheidewand für die neue Spaltung angelegt wird. Unterbleibt aus irgend welchen äußeren oder inneren Ursachen die Ausbildung der Trennungswand, dann erreichen die Stäbchen die doppelte bis dreifache Länge der normalen Formen, können auch zu langen, unsegmentierten oder nur stellenweise segmentierten Fäden auswachsen (T. VII, Fig. 3). Solche Bilder sind bei reichlicher Nahrung und kräftigem Wachstum eben nicht selten und sind als Ernährungsmodifikationen des normalen Entwicklungsganges aufzufassen. Sie unterscheiden sich von den ähnlichen, in absterbenden Kulturen



sich entwickelnden, fadenförmigen Gebilden dadurch, daß die Fäden meistens nur von geringer Länge und nicht körnig, aufgebläht, geschlängelt oder in anderer Weise krankhaft verändert sind, vielmehr das normale Aussehen der gewöhnlichen Stäbchen behalten und nach einiger Zeit durch Ausbildung und Spaltung der Scheidewände in letztere zerfallen.

Die Teilungen vollziehen sich im allgemeinen in der Weise, daß, nachdem das Stäbchen zur etwa doppelten Länge herangewachsen ist, in der Mitte eine Scheidewand angelegt wird; während nun letztere nach und nach sich ausbildet und verdickt, wächst eine jede der durch die Scheidewand getrennten Tochterzellen in die Länge. Ist die Scheidewand schon fertig gebildet, dann wird sie in der Mitte gespalten und die beiden in der Spaltungsebene liegenden Membranlamellen fangen an auseinanderzuweichen und sich voneinander zu entfernen, und zwar infolge des Zuges, welchen die beiden vorwiegend an ihren freien Enden fortwachsenden Tochterzellen auf dieselbe ausüben. Dabei wird der mit dem fortschreitenden Auseinanderweichen der beiden Membranlamellen die die beiden Tochterzellen umhüllende feine Gallerthülle, welche unter gewöhnlichen Umständen sich der Beobachtung entzieht, auseinandergezogen und zieht sich in dem Maße, als die beiden Tochterzellen sich voneinander entfernen, zu einem immer dünner werdenden Faden zusammen, welcher die beiden Zellen brückenartig verbindet (T. VII, Fig. 4). Ist die Gallerthülle stärker entwickelt und dicht, dann kann man diese Verbindungsbrücke schon *intra vitam* an ungefärbtem Material beobachten, sonst aber nur an gefärbten Präparaten und dann, wenn bei reichlicher Schleimabsonderung die Teilungsvorgänge sich verlangsamen und schleppend verlaufen. Das Zerreißen dieses Verbindungsfadens und die Abtrennung der beiden Tochterzellen voneinander erfolgt in der Regel zu einer Zeit, wo in den letzteren alle Vorbereitungen zu einer neuen Teilung schon abgeschlossen sind und die Zellen sich zur Anlage einer neuen Scheidewand anschicken. Die Zeit, welche zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spaltungsakten der Schwesterindividuen verstreicht, beträgt nach meinen Beobachtungen bei einer Temperatur von 27—28° C. und mittelgünstigen Aeration- und Ernährungsverhältnissen ungefähr eine Stunde (s. Fig. 2, Taf. VII und deren Erklärung). Da die Teilungen sowohl in den ruhenden als auch in den schwärmenden Zellen sich in gleicher Weise abspielen und die



Tochterzellen selbst nach ihrem Auseinanderweichen noch lange Zeit durch den Verbindungsfaden der gemeinschaftlichen Schleimhülle zusammengehalten werden, so ist es leicht erklärlich, weshalb die Mehrzahl der Stäbchen in Form von Doppelstäbchen auftritt. Nicht selten findet man jedoch auch Drei- und Vierstäbchenverbände, dagegen kommen längere Ketten von Stäbchen in diesem Lebensstadium nicht vor.

Die vegetativen Stäbchen sind zumeist von weißer, mattglänzender Farbe und scheinen alsdann einen durchaus homogenen oder äußerst fein granulierten Inhalt zu haben; in anderen Fällen sind sie mehr durchscheinend und dann sieht man auch deutlich, daß die Zellen mit einem feinkörnigen, dichten Plasma mit einzelnen stark lichtbrechenden und von einem hellen Hof umgebenen Körnchen erfüllt sind. Dieses verschiedene Lichtbrechungsvermögen der Stäbchen scheint mit der Beschaffenheit und Dichtigkeit des Ektoplasmas, bezw. der äußeren Schleimhüllen im Zusammenhang zu stehen, denn behandelt man solche homogen erscheinende Zellen mit Anilinfarben oder mit Jodjodkaliumlösung, welche die Schleimhüllen mehr oder weniger stark koagulieren, so tritt auch in den undurchsichtigen Zellen eine deutliche Differenzierung des Zellinhalts, wobei der Cytoplast und die in demselben enthaltenen stark lichtbrechenden und von einem hellen Hof umgebenen Körperchen: — der Zellkern oder, wenn mehr vorhanden, die Zellkerne — sich mehr oder weniger scharf unterscheiden lassen. Befindet sich die Zelle im Teilungsstadium, so sieht man auch an der Stelle, wo die Scheidewand angelegt wird, einzelne Körperchen von der gleichen Beschaffenheit, wie die Zellkerne, um die Zellwand der Mutterzelle angeordnet. Daß die fraglichen Gebilde wirkliche Zellkerne, bezw. Zellkernäquivalente sind, die sich an der Teilung der Zelle, bezw. Ausbildung der Scheidewand aktiv beteiligen, dafür werde ich im nächsten Kapitel überzeugende Beweise bringen. Hier wird nur kurz von diesen geformten Zellorganen Erwähnung getan, um das Bild der morphologischen Ausbildung der Zelle zu vervollständigen. Außer dem Cytoplast und den Zellkernen, bezw. Kernäquivalenten findet man in diesem Lebensstadium, — immer normale und für die Entwicklung der vegetativen Lebensformen günstige Bedingungen vorausgesetzt. — keine anderen geformten Inhaltsbestandteile, weder Vakuolen, noch Fett-, Glykogentröpfchen oder Volutinkugeln. Nach außen ist die Zelle von einer zarten, fein konturierter



ten Membran umgeben, deren äußere Schichten mehr oder weniger gequollen sind und die schon oben erwähnte Außenschleimhülle um die Zelle bilden. Anilinfarben nehmen die vegetativen Zellen nur schwer und in geringen Mengen auf und werden von ihnen blaß in den entsprechenden Farbentönen gefärbt; mit Jodjodkaliumlösung, ob verdünnt oder konzentriert, färbt sich der Protoplast blaßgelb.

Dieses Bild gewähren die vegetativen Stäbchenformen in kräftig sich entwickelnden Kulturen solcher Nährlösungen, zu denen ein wirksames Humat in entsprechender Menge zugesetzt wurde. Man sieht dann in den ersten 2—3 Tagen der Kultur nur die soeben geschilderten Stäbchenformen, welche auch später bis zum fünften bis siebenten Tage dominieren und meistens auch lebhaft beweglich sind, um mit Erschöpfung des Nährbodens den Übergangsformen und den Sporulationsformen Platz zu räumen. Dasselbe Bild gewähren Kulturen mit Zusatz von Holz- und Knochenkohle und mit Eisenoxydsakcharat, doch nur in den ersten 24 bis höchstens 48 Stunden. Nach dieser Zeit findet man in diesen Kulturen als vorherrschende Form ebenfalls noch Stäbchen, aber von anderer Form und Beschaffenheit. Dieselben sind gewöhnlich kürzer und als Einzelstäbchen von länglich ovaler oder auch kurz keulenförmiger, als Doppelstäbchen von biskuitförmiger Gestalt, zeigen eine verhältnismäßig dicke, doppelt konturierte Membran und einen nur wenig differenzierten Inhalt, welcher im Gegensatz zu den früheren Stadien sich jetzt mit gewöhnlichen Anilinfarben intensiv färbt (T. VII, Fig. 5). Zellkerne oder Kernäquivalente (chromatische Körperchen) sind im Zellinhalt in der Regel nicht vorhanden oder kommen verhältnismäßig selten vor; findet man aber solche im Zellinhalt, dann fehlt die äußere doppelt konturierte Membran und der intensiv färbbare Zellinhalt füllt das ganze Lumen bis an die äußere Grenzlinie aus (T. IX, Fig. 7 b). Diese Kurzstäbchen sind bald mehr oder weniger lebhaft beweglich, bald unbeweglich und sammeln sich gerne an der Oberfläche der Flüssigkeit und längs der Gefäßwände an, wo sie sich entweder in Kokken umwandeln oder zu langen, kettenartigen Fäden auswachsen, jedenfalls aber die an der Oberfläche und an den Glaswänden sich bildenden schleimigen Häute und Belege veranlassen. Soviel ich beurteilen kann, scheinen die schon oben erwähnten Photogramme von Beijerinck und Krzemieniewski, welche von den Verfassern als „junge Kultur von 24 Stunden“ und „sehr junger Azotobaeter“, beide einer



Agarkultur entnommen, bezeichnet werden, sich vorwiegend auf diese Stäbchenform zu beziehen. Die Vermehrung dieser Form, die ich ebenfalls direkt unter dem Mikroskop verfolgt habe, geht in ähnlicher Weise, wie weiter oben beschrieben, vor sich, doch sind die Teilungen verlangsamt und spielen sich in einem Zeitraum von  $1\frac{1}{2}$ — $1\frac{3}{4}$  Stunden ab<sup>1)</sup>.

Auch diese Stäbchen, die als Übergangsformen zu den Fruktifikations- oder Kokkenformen zu betrachten sind, weisen in der Regel keine sonstigen Inhaltsbestandteile, wie Vakuolen, Glykogen, Fett u. dgl. auf. Körnige Bestandteile nicht chromatischer Natur, insbesondere Glykogen, sind in ihnen erst in einem späteren Entwicklungsstadium anzutreffen; dagegen scheinen Vakuolen, ebenso wie für die Anfangsstadien der vegetativen Propagation, nur unter besonderen, nicht gerade als günstig zu bezeichnenden Lebensverhältnissen aufzutreten, worauf ich noch weiter unten zu sprechen kommen werde.

Fruktifikative Formen und Sporenbildung. Wie schon oben erwähnt, sind die zuletzt beschriebenen kurzgliedrigen Stäbchenformen als Vorstadien der beginnenden Fruktifikation zu betrachten. Indem die aus den Teilungen hervorgehenden Tochterzellen immer kürzer werden und gleichzeitig mehr oder weniger an Dicke zunehmen und an ihren freien Enden sich abrunden, kommen Gestalten zustande, die sich der Dreiviertelkugel- und der Halbkugelform immer mehr nähern. In manchen Kulturen sind die so entstandenen Formen breit biskuitförmig (T. VII, Fig. 5 u. 6), in anderen, mit demselben Impfmateriale und in denselben Nährlösungen angestellten ist die Biskuitform mehr länglich, zugespitzt, d. h. die beiden Zellen des in Entstehung begriffenen *Diplococcus* sind in einen kurzen Schnabel ausgezogen; namentlich in Tropfenkulturen ist mir diese letztere Form sehr häufig vorgekommen (T. VII, Fig. 6 B). Dabei ist zu beachten, daß sich diese Biskuitformen aus den beiden im vorigen Abschnitt beschriebenen Modifikationen der vegetativen Stäbchen entwickeln können und tatsächlich entwickeln. Im ersteren Falle bleiben sie zartwandig und gewöhnlich auch schwach tingierbar, obgleich sie im allge-

<sup>1)</sup> Ob diese Zeitdauer auch für gewöhnliche Kulturen zutrifft, lasse ich unentschieden, bemerke jedoch, daß die fraglichen Tropfenkulturen schon nahe der Erschöpfung waren und bald in das Sporulationsstadium eintraten.



meinen Farbstoffe reichlicher aufspeichern und zuweilen sogar intensive Färbung zeigen, im anderen Falle sind sie ebenso wie ihre Mutterzellen von einer derberen, doppelt konturierten und nicht färbbaren Membran umgeben, während ihr Inhalt sich in diesem Stadium noch sehr intensiv färbt.

Die weitere Entwicklung dieser beiden Formen verläuft, im Grunde genommen, in gleicher Weise, doch sind auch beachtenswerte Unterschiede vorhanden.

Fassen wir die aus den zartwandigen Stäbchen — den vegetativen Stäbchen im engeren Sinne — hervorgegangenen Formen zuerst ins Auge, so bleiben dieselben vorerst auch weiter zartwandig und ihr Inhalt verändert sich nur insoweit, als im Cytoplasma neben dem Zellkern, welcher in diesem Stadium besonders groß und glänzend erscheint, noch andere Inhaltsbestandteile in Form von stärker lichtbrechenden Körnchen oder Tröpfchen erscheinen; letztere färben sich nicht mit Anilinfarben, nehmen aber mit schwacher Jodjodkaliumlösung eine intensiv rotbraune Farbe an, sind demnach als Glykogen-tröpfchen anzusehen. Während nun das Glykogen in den Zellen sich in wachsenden Mengen aufspeichert, verquellen die Mutterzellmembranen der beiden biskuitförmigen Zellen, der frei gewordene Protoplast rundet sich zu einem *Coccus* ab und umgibt sich nach außen mit einer neuen zarten Membran. Auf diese Weise entstehen aus den zwei kurz stäbchenförmigen und zu einer Biskuitform vereinigten Zellen zwei kugelrunde Kokken, die noch eine Zeitlang durch den Schleim der verquellenden Mutterzellmembran zusammengehalten werden, später sich voneinander trennen (Fig. 6 A u. C, Taf. VII). Da jedoch dieser Vorgang sich gleichzeitig in den meisten Zellen der zu größeren oder kleineren Kolonien angehäuften Stäbchen, bzw. den aus denselben hervorgegangenen Biskuitformen abspielt, so entstehen bald große Kolonienhaufen von dichtgedrängten und in eine Schleimmasse eingebetteten Kokken von regelmäßiger, kugelförmiger Gestalt. Ist der Entwicklungsgang ein normaler, wie dies in Nährlösung mit wirksamen natürlichen Humaten in der Regel der Fall ist (zuweilen unterbleibt in solchen Nährlösungen aus noch nicht aufgeklärten Ursachen die Umwandlung der Stäbchen in Kokkenformen und kommt nur mehr sporadisch vor), so verwandeln sich die so gebildeten Kokken direkt in Sporen, indem sie sich nach außen mit einer derben, doppelt konturierten und bald nachher sich braun



verfärbenden Membran umhüllen. Bevor jedoch dies geschieht, gehen im Zellinhalte wichtige Veränderungen vor sich, indem der ursprünglich in Einzahl vorhandene Zellkern sich in zwei Tochterkerne teilt und diese durch weitere Teilungen in vier Zellkerne zerfallen, die sich in bestimmter Weise gruppieren, worüber Näheres im nächsten Kapitel berichtet werden soll. Mit voller Ausreifung der Sporen wird der körnige Inhalt aufgelöst, erhält ein feinmaschiges Aussehen und färbt sich gleichmäßig und intensiv mit Anilinfarben. An gefärbten Sporen sieht man eine zentrale kugelförmige oder ovoide, sich stark färbende Masse, welche von einem helleren, schwach gefärbten Hof umgeben ist und nach außen von einer doppelt konturierten Membran (der Sporenhaut) begrenzt wird.

Sind die Lebensbedingungen weniger günstig, was in Tropfenkulturen bei dichtem Verschuß zufolge ungenügenden Luftzutritts öfters eintritt, aber auch in Kulturkolben bei Zusatz von sehr geringen Mengen von Humaten an den in der Tiefe sich entwickelnden Vegetationen beobachtet wurde, so kommt es zwar zur Ausbildung der Kokkenformen und zur Verquellung der Mutterzellmembranen, aber ihre weitere Entwicklung und Umwandlung in Sporen bleibt in der Regel aus. In diesem Falle bilden die Kokken keine Kolonienanhäufungen, vielmehr treten sie als Einzelkokken auf und zeigen ein sehr charakteristisches Aussehen. Sie sind kugelförmig, von einer unter gewöhnlichen Beobachtungsbedingungen unsichtbaren Schleimhülle umgeben und zeigen an der Peripherie, exzentrisch gelegen, ein stark lichtbrechendes Körperchen, dem auf der anderen Seite ein halbmondförmiger, schwächer lichtbrechender Streifen gegenüberliegt (T. VII, Fig 7). Wendet man stärkere Vergrößerung an, so überzeugt man sich, daß das exzentrisch gelegene glänzende Körperchen ein Zellkern ist, welchem sich das Cytoplasma in Form eines kugelförmigen Gebildes angelagert hat. Die an den Zellkern unmittelbar angrenzenden Plasmaschichten sind hell und von geringer Dichte, nehmen aber mit Entfernung vom Zellkern an Dichte zu und kondensieren sich an der gegenüberliegenden Seite zu dem oben erwähnten halbmondförmigen, stärker lichtbrechenden Streifen (T. VII, Fig. 7 B). Glykogeneinschlüsse, welche in diesem Lebensstadium regelmäßig in den Zellen auftreten, werden in der Regel nicht beobachtet; doch geben solche Kokken zuweilen die für Glykogen charakteristische Reaktion mit Jodjodkaliumlösung. Die meisten so geformten Kokken entwickeln sich



nicht weiter und gehen zugrunde; einzelne umhüllen sich aber, wie die normal ausgebildeten Kokken, mit derben, doppelt konturierten Membranen und werden so zu Sporen (Taf. VIII, Fig. 7 B s). Die Auskeimung dieser Sporen habe ich nicht beobachtet, doch mag es Zufall gewesen sein, daß die in Tropfenkultur fixierten Sporen dieser Art nicht gekeimt haben. Da, wie wir noch sehen werden, die Sporenbildung ebenso, wie die übrigen Gestaltungsakte des *Az. chroococcum* sehr variabel ist, so liegt vorläufig kein Grund zur Annahme vor, daß diese Art der Sporenbildung ganz abortiv ist.

Gehen wir jetzt zur Betrachtung der zweiten Form der vegetativen Stäbchen über. Wie erinnerlich, unterscheiden sich diese Stäbchen von den ersteren dadurch, daß sie von einer doppelt konturierten, nicht färbbaren Membran umgeben sind und einen stark färbbaren, aber wenig differenzierten Inhalt führen. Ihre Weiterentwicklung beruht im einfachsten Falle darauf, daß die ganze Zelle durch Verdickung der Zellmembran und Differenzierung einer äußern, als Exo- und einer inneren, als Endosporium zu bezeichnenden Schicht sich zur Spore umwandelt. Dies kann in einem beliebigen Entwicklungsstadium dieser Stäbchenform geschehen, insbesondere dann, wenn das Substrat rasch austrocknet, wie dies auf Agarnährboden oft vorkommt. In diesem Falle bekommt man Sporengestalten zu sehen, welche sowohl in bezug auf äußere Form als auch auf den cytologischen Inhalt genau mit den entsprechenden Entwicklungsstadien der vegetativen Formen übereinstimmen. Fig. 8, Taf. VII, veranschaulicht eine Anzahl solcher Sporen; dieselben zeigen einen durchaus homogenen, nur bei starken Vergrößerungen fein netzartig erscheinenden, stark tingierbaren Inhalt, welcher nach außen von einer derben, doppelt konturierten Membran umgeben ist; die äußere Schicht dieser Membran färbt sich mit Anilinfarbstoffen intensiv, die innere bleibt farblos; der plasmatische Inhalt wird gleichmäßig und intensiv gefärbt. Die äußere Form dieser Sporen variiert in ziemlich weiten Grenzen; Gestalten, wie Fig. 8 a, sind verhältnismäßig selten, die häufigste Form ist für isolierte Sporen die ovoide oder kurz zylindrische, für Doppelsporen die zugespitzte Biskuitform, doch kommen auch fast kugelförmige Gestalten vor. Ihr Hauptmerkmal besteht darin, daß sie die Gestalten der vegetativen und der Übergangsformen behalten und von Anfang an keine geformten Inhaltsbestandteile, insbesondere auch keine Zellkerne oder Zellkernäquivalente enthalten. Wie



schon oben erwähnt, findet diese Art der Sporenbildung selten und hauptsächlich auf Agarnährböden statt.

In flüssigen Nährmedien mit Zusatz von wenig wirksamen Humaten, von Eisenhydroxydsakcharat, Kohlensäurem Kalk, Kieselsäure, von Holz- und Knochenkohle und dgl., unter Umständen also, welche die Entwicklung dieser zweiten Form der vegetativen Zustände *sensu latiore* begünstigen, geht die Entwicklung der fruktifikativen Formen und die Sporenbildung in anderer Weise vor sich. Hier muß man zwei Fälle unterscheiden, und zwar, ob die fraglichen Formen sich an der Oberfläche oder in der Tiefe der Nährlösung weiter entwickeln. Im ersten Falle löst sich nach mehreren vorbereitenden Teilungen, welche zu immer kürzeren und mehr abgerundeten Zellen führen, die Mutterzellmembran der letzteren in Schleim auf, die Zellen runden sich ab und nehmen Kokkengestalt an; im Zellinhalt wird Glykogen in reichlicher Menge aufgespeichert, es erscheint ein individualisierter Zellkern, welcher durch Teilungen in vier Tochterkerne zerfällt, der Kokkus nimmt eine charakteristische wabige Struktur an, umhüllt sich schließlich mit einer derben Membran und wird zur Spore. Hier verläuft also der Akt der Sporenbildung in der gewöhnlichen Weise vor sich, wie wir ihn in mit wirksamen Humaten versetzten Nährlösungen kennen gelernt haben. Anders gestaltet sich die Weiterentwicklung in den in der Tiefe der betreffenden Nährlösungen vegetierenden Stäbchen. Wie schon im Kapitel über allgemeine Morphologie hervorgehoben wurde, werden in den betreffenden Nährlösungen eigentümliche „Gallertkolonien“ gebildet, welche an die Schleimkolonien gewisser einzelliger Algen (*Gloeocapsa*, *Aphanocapsa*) lebhaft erinnern. Diese Gallertkolonien haben je nach Art der Zusatzstoffe verschiedene, für bestimmte Stoffe jedoch zumeist sehr charakteristische Form und Größe. Insbesondere begünstigt Eisenhydroxyd, desgleichen Manganhydroxyd namentlich, wenn dasselbe für sich allein in Anwendung kommt und in größeren Mengen zugesetzt wird, die Entwicklung der Gallertkolonien; die Kolonien, welche dann zum Vorschein treten, sind durch ihre Mächtigkeit und Größe sowie durch die Dichtigkeit und Schichtung der Schleimhüllen besonders ausgezeichnet. Ein ungefähres Bild, wie solche Gallertkolonien sich bilden, geben die Figuren 9a—c der Taf. VII, welche die Anfangsstadien einer jungen und durch Zellteilungen sich vergrößernden Kolonie darstellen. In älteren Kulturen von 3—5 Tagen wach-



sen diese Kolonien zuweilen zu solcher Größe heran, daß eine einzelne Kolonie das ganze Gesichtsfeld und darüber hinaus einnehmen kann. Dabei sind die Gallertbullen namentlich junger Kolonien manchmal so dicht, daß sie sich schon unter gewöhnlichen Beobachtungsbedingungen, ohne Färbemittel, von der umgebenden Flüssigkeit abheben; sonst werden sie mittels verdünnter Methylenblaulösung (1 : 10) oder noch besser einer nicht zu konzentrierten wässerigen Mischung von Methylgrün und Fuchsin sichtbar gemacht; letzteres Färbemittel bietet noch den Vorteil, daß es eine Differenzialfärbung der Zellkomponenten und der die Zellen umgebenden Schleimhüllen verursacht. Auch die übrigen oben erwähnten Zusatzstoffe bewirken die Schleimhüllenbildung, doch ist die Art ihrer Wirkung eine andere und die daraus resultierenden Gallertkolonien sind anders gestaltet. So sind die bei Zusatz von kohlensaurem Kalk entstehenden Gallertkolonien bedeutend kleiner und ihre Gallerthülle dünner und kompakter, nach außen scharf begrenzt; ältere, noch nicht verflüssigende Kolonien zeigen oft Kugelgestalt und die in ihnen eingeschlossenen Zellen sind mit ihren Schleimkapseln nach Art einer *Gloeocapsa* so ineinander geschaltet, daß man ihre gemeinsame Abstammung von einer einzelnen Zelle genau verfolgen kann. Ein anderes Bild bieten wieder die „auf Holzkohle“ gewachsenen Kolonien. Dieselben sind im jugendlichen Zustand von den auf kohlensaurem Kalk gewachsenen nur wenig verschieden; ältere, aus zahlreichen (20 und mehr) Zellen bestehende Kolonien weisen nur eine gemeinsame, scharf umschriebene Gallerthülle auf, in welcher die haufenweise und ohne ihre eigenen Schleimkapseln zusammengedrängten Zellen wie in einem Sack eingeschüttet liegen. Mit Knochenkohle versetzte Nährlösungen zeigen nur vereinzelt und schwach entwickelte Schleimkolonien, wobei letztere auch ganz ausbleiben können, während Kieselsäurenährboden deren Entwicklung ebenfalls begünstigt.

Diese Beispiele mögen genügen, um die Tatsache festzustellen, daß die Bildung von Gallertkolonien durch *Azotobacter* keine regelmäßige Erscheinung ist, vielmehr nur als eine durch bestimmte Reizmittel hervorgerufene Funktion des Zellebens aufzufassen ist; sie ist demnach sowohl in physiologischer als auch in morphologischer Beziehung nur als eine „Anpassungsform“ der in irgend einer Weise gestörten Zellebensfunktionen zu betrachten. Indem ich bezüglich der physiologischen Rolle dieser Anpassungsformen auf



den zweiten Teil dieser Abhandlung verweise, knüpfe ich die weitere Darstellung der morphologischen Entwicklung des *Azotobacter* an die vegetativen Stäbchen *sensu latiore* wieder an.

Diese Stäbchen, die sich, wie oben dargetan wurde, unter den gleichen Bedingungen, wie die „Gallertkolonien“ entwickeln, müssen vom physiologischen und morphologischen Standpunkte aus ebenfalls als „Anpassungsformen“ betrachtet werden; da sie nämlich, wie oben schon erwähnt, in denselben Nährsubstraten und unter denselben Bedingungen wie die Gallertkolonien entstehen, so muß auch die Ursache ihrer Entstehung die gleiche sein. Dies beweist ihre Weiterentwicklung ganz evident. Es wäre ganz falsch, wenn man auf Grund der bisherigen Untersuchungen annehmen wollte, daß nur die Kokkenformen des *Azotobacter chroococcum* sich mit Schleimhülle umgeben; dies tun auch die vegetativen Stäbchen der zweiten Kategorie, nur wurden diese Phasen der Entwicklung von den früheren Forschern übersehen. Fig. 11, Taf. VII, zeigt uns eine kettenförmige Gruppe von Stäbchen dieser Art, und zwar in *a* unter gewöhnlichen Beobachtungsbedingungen in Wasser, in *b* dieselbe Gruppe nach Behandlung mit Methylenblau aus einer Kultur mit kohlensaurem Kalk und Glukose; in *c* ist ein aus mehreren, jedoch durch Scheidewände nicht getrennten Zellen zusammengesetzter Faden mit Fuchsin-Methylgrünlösung behandelt, abgebildet; im letzteren Bilde ist auch der intensiv gefärbte Inhalt mit chromatischen Körnchen gezeichnet. Solche Bilder sind in Kulturen mit beginnender Gallertkolonienbildung sehr häufig anzutreffen. Sie beweisen, daß die Gallertumhüllung schon an jungen, stäbchenförmigen Zuständen beginnt und ihren Höhepunkt mit Ausbildung der Kokkenformen im Fruktifikationsstadium erreicht. Man kann die Entwicklung dieser Gallerthüllen von den einfachen und Doppelstäbchen an durch alle intermediären Stadien der Kurzstäbchen und Biskuitformen bis zu den mit stark gequollenen Schleimhüllen umgebenen Kokken und größeren Gallertkolonien derselben Schritt für Schritt verfolgen. Ob sämtliche Zellen einer solchen Kultur diese Evolution durchmachen, scheint mir sehr unwahrscheinlich. Notwendig ist es nicht, da ja in einer Flüssigkeitsschicht von zirka 2—3 cm Höhe verschiedene Bedingungen der Aeration u. dgl. in den verschiedenen Schichten sein müssen; tatsächlich findet man in einer jeden, selbst sehr stark „verschleimenden“ Kultur eine Anzahl von Stäbchen und Kokken, die keine Schleimhüllen besitzen. Eine wei-



tere Tatsache ist es, daß man in jungen Kulturen an der Oberfläche und in den oberen Schichten der Nährlösung Gallertkolonien so lange vermißt, bis dieselben sich am Boden des Kulturgefäßes und überhaupt in den tieferen Schichten der Flüssigkeit gebildet haben; erst dann wandern sie nach oben, um sich hier unter dem Einfluß der Luft, soweit die übrigen Lebensfaktoren in genügender Quantität und Qualität vorhanden sind, in normale Formen umzuwandeln.

Die in den Gallertkolonien eingekapselten Stäbchen und Kokken vermehren sich in gewöhnlicher Weise durch Zweiteilungen, wobei sich die aus den Teilungen hervorgegangenen Tochterzellen nach ihrem Anseinanderweichen jede für sich mit einer besonderen, mehr oder weniger scharf gezeichneten Membran umgibt, welche ihrerseits wieder mehr oder weniger verquillt. Ist die Verquellung stark, dann fließt die neue Membran mit dem Schleim der verquollenen Membranen älterer Generationen zu einer homogenen Masse zusammen; ist sie dagegen gering, dann sieht man dieselbe als innere Kapsel in den äußeren Kapseln der Mutterzellen liegen und es entstehen Bilder, die den Gallertkolonien von *Gloeocapsa* vollkommen gleichen. Die im Innern der Gallerthüllen liegenden Stäbchen und Kokken sind stets unbeweglich, sie können jedoch aus der Gallerthülle jederzeit ausschlüpfen, und ich habe öfters dieses Ausschlüpfen direkt beobachtet. Auch kann man das Ausschlüpfen durch einen gelinden Druck auf das Deckgläschen mechanisch herbeiführen, woraus, wie aus dem schwachen Lichtbrechungsvermögen, auf eine lose Beschaffenheit der Schleimhüllen geschlossen werden kann. Es bleibt dann an der Stelle, wo der Kokkus sich befand, ein leerer, nach außen wie gefranster Raum zurück. Diese Erscheinungen deuten auch darauf hin, daß ein organischer Zusammenhang zwischen den Schleimhüllen und den in dieselben eingebetteten Zellen nicht besteht und daß erstere wohl nur als Schutzmittel gegen irgend welche schädliche Einflüsse der Umgebung von den Zellen nach außen abgeschieden werden.

Die in Schleimhüllen eingebetteten Stäbchen teilen sich ebenso wie die hülsenfreien nur nach einer Richtung des Raumes, senkrecht zu ihrer Längsachse. Anders verhält sich die Sache bei den Kokkusformen. Diese können sich sowohl in der Längsrichtung oder, präziser ausgedrückt, in der Wachstumsrichtung der Mutterstäbchen, aus denen sie hervorgegangen sind, aber auch senk-



recht zu dieser Richtung teilen. Ich habe diesen Wechsel in den Teilungsflächen an jungen Kolonien direkt unter dem Mikroskop verfolgen können. Es wäre jedoch falsch zu meinen, daß die aufeinanderfolgenden Teilungsebenen sich, wie beim *Micrococcus*, regelmäßig miteinander kreuzen. Im Gegenteil teilt sich der *Azotobacter-coccus* ebenso gut und häufig nur nach einer Richtung des Raumes, in welchem Falle die wohl zuerst von H. Fischer (2) beobachteten *Streptococcus*-Ketten und -Fäden entstehen; gehen die Teilungen nach zwei Richtungen des Raumes vor sich, dann entstehen Zellenflächen aus 4 bis 8 Gliedern (s. Taf. VIII, Fig. 1 a und b und Erklärung), wie bei der Algengattung *Merismopedia*. Größere Zellenflächen habe ich bis jetzt nicht beobachtet. H. Fischer sagt (a. a. O., S. 137), daß *Azotobacter* sich nacheinander nach allen drei Richtungen des Raumes teilt, wodurch die charakteristischen *Sarcina*-Pakete entstehen. Ich habe diese Angabe H. Fischer's nicht bestätigen können, trotzdem ich mir alle erdenkliche Mühe gegeben habe, die Art und Weise der Entstehung der sogen. Sarcinaformen klarzulegen; ich habe aber nur dies konstatieren können, daß die in jungen Kolonien eingeschlossenen Kokken ihre gegenseitige Lage fortwährend wechseln und sich vorwiegend nur nach einer Richtung des Raumes teilen. Übrigens zeigen die sarcinaartigen Kolonien des *A. chroococcum* nie die für die Gattung *Sarcina* charakteristischen regelmäßigen Würfelpakete, vielmehr stellen sie im Jugendzustande mehr oder weniger der Kugelgestalt genäherte und in älteren Kulturen, wo sie sich zu größeren Anhäufungen vereinigen, Konglomerate von unregelmäßiger Gestalt dar, in denen die einzelnen Zellen verschieden, meist aber kettenartig durch seitliche Ausläufer miteinander verbunden sind. Nach alledem muß die Ansicht H. Fischer's, „daß *Azotobacter* alle drei Hauptgattungen der Kugelbakterien (*Streptococcus*, *Micrococcus* und *Sarcina*) in sich vereinigt“, bis auf weiteres als nicht bewiesen zurückgewiesen werden.

Was den Teilungsakt der Azotobacterkokken selbst anlangt, behauptet H. Fischer, daß dieselben sich „ohne vorherige Längsstreckung, wie das für die Coccaceen als Regel gilt, teilen“. Ich muß auch dieser Behauptung Fischer's widersprechen. Die Azotobacterkokken sind nach vollzogener Teilung und Isolierung der Tochterzellen einförmig kugelförmig. Bevor sie sich von neuem teilen, strecken sie sich nach einer Richtung, nehmen längliche Gestalt



an und erst dann erscheint in der Mitte der länglichen Zelle die Anlage der Scheidewand (Taf. VII, Fig. 5 z und 10 d, das obere Paar), die sich allmählich verdickt, während gleichzeitig an dieser Stelle eine Einschnürung der Mutterzelle zum Vorschein kommt. Denselben Vorgang habe ich übrigens schon vor 25 Jahren (24) für die Gattung *Micrococcus* in ihrer heutigen Begrenzung — an dem von mir näher studierten Harnferment *Micrococcus ureae*, oder wie ich ihn damals wegen der sich regelmäßig kreuzenden Teilungsebenen benannte, *Merista ureae* beobachtet; doch will ich damit noch nicht sagen, daß bei anderen *Micrococcus*-Arten die Teilungen in der von Migula (25) geschilderten Weise, d. h. ohne vorherige Längsstreckung, nicht vor sich gehen.

Bezüglich der übrigen morphologischen Merkmale der in den Gallertkolonien sich vermehrenden Kokken wäre noch zu erwähnen, daß dieselben von verschiedener Größe sind und einen verschiedenen differenzierten Inhalt zeigen. Die einen sind verhältnismäßig groß, 5 bis 6  $\mu$  im Durchmesser, und zeigen einen mehr homogenen Inhalt, der sich mit Fuchsin-Methylgrün gleichmäßig tief ziegelrot bis karminrot färbt; auch die sie umgebende äußere Schleimhülle nimmt diese Farbe schnell an und koaguliert zu tief karminroten Flecken, die den Kokkus allseitig umhüllen. Nach diesem Verhalten gegenüber dem genannten Farbstoffe und den übrigen Anilinfarben zu schließen, wäre diese Art von Kokken morphologisch den vegetativen Stäbchen der zweiten Kategorie gleichzustellen. Eine zweite Form von Kokken zeigt eine deutliche Differenzierung des Zellinhalts und eine ausgesprochen wabige Struktur; sie enthalten neben Glykogen in reichlicher Menge noch 1, 2 bis 4 Zellkerne oder Zellkernäquivalente, die gewöhnlich peripherisch der äußeren Membran der Zelle angelagert sind. Diese Kokken färben sich im Gegensatz zu den ersteren nur sehr schwer und auch dann nur teilweise; zuerst und verhältnismäßig schnell färbt sich die äußere Membran und erscheint als ein tiefblauer Saum um den Kokkus herum; erst später, nach einer bis mehreren Stunden, färben sich die Zellkernelemente intensiv blau bis violettschwarz; zuweilen wird auch das feine wabige Netz zwischen den Glykogenröpfchen blau gefärbt.

Die in der Tiefe der Nährlösungen vegetierenden Gallertkolonien gelangen früher oder später an die Oberfläche und schließen erst hier ihren Entwicklungsgang ab. Ob sie dabei zufolge der starken



Verquellung ihrer Membranen passiv emporgehoben werden, oder ob sich an diesem Vorgang die in ihnen eingeschlossenen Zellen aktiv beteiligen, muß ich dahingestellt sein lassen. Ich halte die erstere Möglichkeit für wahrscheinlicher, denn der Schleim ist von sehr losem Gefüge und man sieht in älteren Kulturen kleinere und größere Schleimflocken in der Flüssigkeit schwimmen und wohl auch hinaufsteigen; auch habe ich nie ältere und ausgewachsene Kolonien umherschwärmen gesehen; nur ganz junge, erst in Entstehung begriffene Kolonien, die eigentlich eine einzelne Kokkuszelle, die sich in eine Gallertkolonie verwandelt, darstellen, habe ich zuweilen im Schwärmerzustand gesehen, wovon weiter unten im Abschnitt über Regenerationsformen noch die Rede sein wird.

Sobald die Kolonien an die Oberfläche der Flüssigkeit gelangen, beginnt der Auflösungsprozeß der Schleimhüllen. Die Schleimhüllen quellen stark auf, der Schleim wird immer dünner und loser und löst sich schließlich in der umgebenden Flüssigkeit ganz auf. Behandelt man die in Auflösung begriffenen Kolonien mit den schleimkoagulierenden Farbstoffen, so erhält man Bilder, wie solche die Figuren 10 *a—d* der Taf. VII veranschaulichen. Ist die Schleimauflösung noch weiter fortgeschritten, so erhält man nach Behandlung mit Färbemitteln nur einen feinen Niederschlag, welcher sich wolkenartig oder auch sternförmig um die frei gewordenen Kokken absetzt (Fig. 6 *C* und 10 *c*, Taf. VII). In diesem Stadium der Schleimauflösung ist zumeist schon eine derbe, doppelt konturierte Membran um die freigewordenen Kokken gebildet; durch weitere Verdickung derselben und Differenzierung in eine äußere, sich braun verfärbende und eine innere, hell bleibende Schicht (das Exo- und Endosporium) wird schließlich der Kokkus zur Spore. Die fertigen Sporen können wieder die gleichen Modifikationen zeigen wie die Kokken, aus denen sie sich entwickelt haben: ihr Inhalt ist entweder nur wenig differenziert und dann stark färbbar oder zeigt eine deutliche Differenzierung in Körnchen von verschiedenem Lichtbrechungsvermögen und nimmt Anilinfarben nur langsam und in nur auf einzelne Inhaltsbestandteile beschränkter Weise auf; die Kokken der ersten Kategorie bilden die normalen, die gekörnten und stark lichtbrechenden Sporen zum Teil normale, zum anderen Teil abortive Formen. Bei ersteren lösen sich mit der fortschreitenden Reife die „Körnchen“ auf, bei letzteren häufen sie sich in der Spore in immer größeren Mengen an und fließen



zu einer stark lichtbrechenden, homogenen Masse, welche den ganzen Innenraum der Spore ausfüllt, zusammen. Sind die Bedingungen zur normalen Sporenbildung nicht vorhanden, dann werden Sporen nicht oder nur vereinzelt gebildet und es treten Involutionsformen anderer Art auf.

Andere Modifikationen der Sporenbildung beruhen darauf, daß die mit dicken Membranen umgebenen und stark färbbaren Stäbchen sich mit Schleimhüllen nicht umgeben, sondern als solche sich durch Teilungen lebhaft vermehren und zu dichten und großen Anhäufungen auswachsen, welche sich schließlich in Sporenhaufen verwandeln. Diese Art der Sporenbildung findet namentlich auf festem Agarnährboden statt.

Schwärmerzustände und Geißeln. Über die Schwärmerzustände des *A. chroococcum* finden sich in der Literatur nur vereinzelte Angaben. Beijerinck (1, S. 577) sagt, daß nur in ganz jungen Kulturen von 24 Stunden eine Anzahl Stäbchen schwache Beweglichkeit zeigt. Da er beim Nachweis der Geißeln auf Schwierigkeiten stieß, wurden auf seine Bitte von Prof. Zettinow in Berlin Präparate angefertigt, welche eine einzelne polare Geißel für die Mehrzahl der beweglichen Individuen ergaben. Beijerinck bemerkt jedoch, daß einzelne Individuen „sicher mehr als eine Geißel, und zwar in seitlicher Stellung, wenn auch dem Pole genähert, besitzen“. Die Angaben Beijerinck's wurden später von Löhnis und Westermann (10) überprüft; diese bestätigen, daß *Azotobacter* nur in sehr jungen Entwicklungsstadien beweglich ist und eine einzelne polare Geißel besitzt. Andere Forscher haben bald keine, bald eine schwache Beweglichkeit der Stäbchenformen beobachtet; nur Krzemieniewski (14) erwähnt, daß junge *Azotobacter*zellen, „in Kondensationswasser gebracht, sich lebhaft bewegen“. Die Kokkenformen sollen nach übereinstimmenden Angaben sämtlicher Forscher ganz unbeweglich sein.

Dem entgegen habe ich gefunden, daß *Azotobacter* in allen seinen Entwicklungsphasen mit Ausnahme des Sporenzustandes Eigenbewegung besitzt. Freilich ist seine Beweglichkeit in Beijerinck'scher Mannit- oder Glukosenährlösung und in den anderen gewöhnlich verwendeten Nährmedien nur eine beschränkte. Wird jedoch die Beijerinck'sche Nährlösung mit geringen Mengen solcher Stoffe versetzt, welche seine Entwicklung und Vermehrungsfähigkeit befördern, dann stellt sich mit der gesteigerten Vermeh-



rung auch eine gesteigerte Schwärmfähigkeit ein. Am günstigsten wirken auf die Eigenbewegung die wirksamen natürlichen Humate und ich habe selbst in Tropfenkulturen mit solchen Nährlösungen Vegetationen erzielen können, deren Individuen von der Auskeimung aus den Sporen an, bis zur Bildung von neuen Sporen lebhaft umherschwärmten; dabei waren zu Anfang sämtliche Individuen, später mit Ausbildung der Übergangs- und der Kokkenformen wenigstens die Mehrzahl derselben lebhaft beweglich. Die Bewegungen der jungen vegetativen Stäbchen sind im großen und ganzen denjenigen ähnlich, welche bei den peritrich begeißelten Bazillen beobachtet werden; nur längere, aus 3—4 Gliedern bestehende Ketten von Stäbchen führen keine Kreiselbewegungen aus und schlagen keine Purzelbäume; gewöhnlich schwimmen sie eine Zeitlang in einer Richtung vorwärts, um dann, ohne umzukehren, denselben Weg zurückzumachen oder einen anderen einzuschlagen. Die in Kokken sich umwandelnden Einzel- und Doppelkurzstäbchen sind zumeist noch lebhaft beweglich und schwärmen unter fortwährendem Wechsel der Bewegungsrichtung in bogigen und kreisförmigen Windungen umher; dagegen bewegen sich Einzelkokken unter schraubenförmiger Drehung um ihre Achse bald schwerfällig, bald pfeilschnell nach einer Richtung. Präparate, die ich unter Anwendung der Löffler'schen Geißel-Färbemethode<sup>1)</sup> angefertigt habe, ergaben peritriche Begeißelung für die vegetativen Stäbchenstadien und eine einzelne Geißel für die Kokkenstadien. Die Zahl der Geißeln wechselt je nach dem Alter der Stäbchen: die jüngsten Stadien zeigen 10—12 und mehr Geißeln, an älteren Stäbchen zählt man deren 4—6—8 und an den Übergangsformen 2—4, manchmal sogar nur eine einzige Geißel. Die Geißeln sind peitschenartig gewunden und 3—4 bis mehrmal so lang, als der Längs-

<sup>1)</sup> Um schöne, instruktive Geißelpräparate mit dieser Färbemethode vom Azotobacter zu erhalten, ist es wichtig, den Kulturtröpfen mit angewärmtem Leitungswasser entsprechend zu verdünnen und die Präparate nicht über einer Bunsenflamme zu erhitzen. Ich habe das von vielen Seiten empfohlene Aufkochen der Präparate über der Bunsen- oder Spiritusflamme, welches nur Zerrbilder verursacht, verworfen und die mit Beize belegten Ausstrichpräparate nur auf kurze Zeit über Wasserdämpfen bis zur schwachen Dampfentwicklung erwärmt, wonach die Farblösung ebenfalls nur für sehr kurze Zeit (15—30 Sekunden) kalt aufgetropft und sofort wieder abgespült wurde. Man erhält so sehr klare und detritusfreie Bilder.



durchmesser der Zelle; sie entspringen an beliebigen Stellen des Zellumfangs, bei kurz stäbchenförmigen Zellen polar an der verjüngten Spitze oder auch seitwärts. Fig. 2, Taf. VIII veranschaulicht die verschiedenen Formen der Begeißelung. Zu erwähnen wäre noch, daß Geißeln sehr leicht abgeworfen werden und daß man bei nur etwas roher Behandlung der Ausstrichpräparate zwar eine Unmasse von abgeworfenen Geißeln, aber nur geißellose Stäbchen erhält. An manchen aus ganz jungen (4—6-stündigen vom Zeitpunkt des Erscheinens der ersten vegetativen Stäbchen gerechnet) Tropfenkulturen angefertigten Präparaten sah ich an einzelnen Stäbchen und Stäbchengruppen eine Masse von sehr feinen und verhältnismäßig kurzen Cilien vom ganzen Zellumfange entspringen, doch habe ich die Sache, anderer Arbeiten wegen, nicht weiter verfolgt und es müssen spätere Untersuchungen entscheiden, ob *Azotobacter* in den allerjüngsten Stadien nicht etwa zahlreichere und anders geformte Geißeln besitzt.

Sporen und Sporenkeimung. Die Sporen des *Az. chroococcum* sind bald kugelrund, bald von länglich ovoider Gestalt, zuweilen bei Diplosporen an den freien Enden schwach zugespitzt oder geschnäbelt, bei größeren Ketten- oder Haufenverbänden an den Berührungsstellen abgeplattet. Sie sind nach außen von einer derben, doppelt konturierten Membran, welche sich mit Anilinfarben stark tingiert und eine äußere dunklere, braun gefärbte und eine innere, hellere Schicht (Exosporium und Endosporium) erkennen läßt, umgeben. Ihr Inhalt ist entweder homogen und wenig differenziert oder mit stark lichtbrechenden Körnchen erfüllt; im ersteren Falle wird er durch Anilinfarblösungen gleichmäßig und intensiv gefärbt, im letzteren bleibt die Färbung anfangs ganz aus, um erst nach längerer Zeit einzelne Körnchen des Zellinhalts als gefärbt erscheinen zu lassen, der Rest bleibt ungefärbt bis auf eine unmittelbar unter der Sporenhaut liegende, dünne Schicht, die zumeist ebenfalls gefärbt wird, und zwar gleichzeitig mit der Sporenmembran. Wendet man konzentrierte Farblösungen an, so werden Sporenmembran und die darunter liegende Schicht so intensiv gefärbt, daß der ungefärbt gebliebene übrige Inhalt ganz verdeckt wird.

Bringt man nun Sporen in einen Tropfen geeigneter Nährlösung und beobachtet sie in der feuchten Kammer bei einer Temperatur von 25—28° C., so sieht man in den ersten 3 bis 5 Stunden keine Veränderungen an ihnen weder in der äußeren Form noch im



Inhalte. Erst nach dieser Zeit erscheinen die Sporen etwas vergrößert, als wenn sie gequollen wären; doch ist diese Quellung auch in den späteren Keimungsstadien nur sehr gering. In den mit homogenem Inhalt erfüllten Sporen gibt sich der beginnende Keimungsprozeß dadurch kund, daß der Inhalt sich aufzuhellen beginnt; dann erscheinen in dem homogenen Inhalt zuerst auf der einen Seite der Spore, dann auch auf der gegenüberliegenden stärker lichtbrechende Streifen von bogenförmiger oder halbmondförmiger Gestalt, die mit ihren weit geöffneten Armen sich einander nähern und zu einem geschlossenen Kreis zusammenfließen, um sich schließlich im Zentrum zu einem stark glänzenden Körnchen zu kondensieren (Taf. VIII, Fig. 3 b, c). Dieses Körnchen teilt sich nach einiger Zeit in zwei, dann jedes von den Tochterkörnchen vom neuen in zwei, so daß schließlich im Zellinhalt vier glänzende Körnchen erscheinen und sich exzentrisch an der Peripherie desselben lagern. Jetzt erscheint der von der Sporenmembran umgebene zentrale Körper ebenso lichtbrechend wie in den mit lichtbrechenden Körnchen erfüllten und nicht oder eigentlich schwer tingierbaren Inhaltsbestandteilen. Dieser zentrale, lichtbrechende Körper ist der im Innern der Sporen vorgebildete Keimling. Er zieht sich zusammen, legt sich mit einem Ende an irgend einer Stelle der Sporenmembran an, während sein hinteres Ende sich von der Sporenmembran zurückzieht (Taf. VIII, Fig. 3 d). An der Stelle, wo der Keimling der Sporenmembran sich angelegt hat, wird diese nach und nach resorbiert, es entsteht hier eine Öffnung, durch welche der Keimling sich nach außen herausdrängt, während sein hinteres Ende in der Sporenmembran noch stecken bleibt (T. VIII, Fig. 3 e). Zuweilen dauert es sehr lange, bis der Keimling sich aus der Sporenhülle herauszwängt. Ist dies geschehen, so liegt er neben der leeren Sporenhaut als ein kleiner *Coccus* von der Form und Beschaffenheit, wie es diejenigen sind, welche bei beginnender normaler Sporulation beobachtet werden (Taf. VIII, Fig. 3 f); er unterscheidet sich von letzteren nur dadurch, daß er nicht so stark lichtbrechend ist und außer den an der Peripherie gelegenen, glänzenden Körnchen keine anderen lichtbrechenden Elemente aufweist.

Der Keimungsprozeß der nicht oder schwer tingierbaren Sporen verläuft im Prinzip in der gleichen Weise mit dem einzigen Unterschied, daß hier, da die lichtbrechenden Körnchen schon vorgebildet sind, die zu ihrer Formation führenden Erscheinungen in



Wegfall kommen. Jedenfalls verliert der zentrale Körper der Spore zunächst das starke Lichtbrechungsvermögen und wird mehr opak durch Auflösung und Vermischung der übrigen nicht färbbaren Inhaltsbestandteile. Ist nun bloß ein lichtbrechendes Körnchen enthalten, so vergrößert sich zunächst dasselbe und teilt sich in zwei, dann in vier Körnchen; sind zwei solche Körnchen vorhanden, so spalten sie sich durch Teilung in vier, die dann eine peripherische Lage einnehmen. Es kommen jedoch auch unreife Sporen vor, wo die vier Körnchen von Anfang an vorgebildet sind; dann ist der Keimling fertig und er bricht in der oben beschriebenen Weise nach außen durch.

Die abgeworfene Sporenhaut (Taf. VIII, Fig. 3 s) zeigt an ihrem ganzen Umfange eine doppelte Kontur mit Ausnahme der Stelle, an welcher sie durch den Keimling durchbrochen wurde; sie ist an dieser Stelle einfach konturiert.

Der junge, aus der Sporenhaut entschlüpfte Keimling wächst bald in die Länge und nimmt eine ovoide oder kurz zylindrische Gestalt mit abgerundeten Enden an. Während seines Wachstums teilen sich die lichtbrechenden Körnchen noch einmal, indem sie gleichzeitig von der Peripherie in die Mitte der Zelle rücken, so daß schließlich acht Körnchen in der jungen Zelle liegen (Taf. VIII, Fig. 3 g). Nun wird in der Mitte der Zelle eine Querwand angelegt und der junge Keimling zerfällt in zwei Tochterzellen, von denen jede vier Körnchen erhält; diese fließen zu einem einzigen, stark lichtbrechenden Korn zusammen, die beiden kokkusartigen Zellen wachsen stark in die Länge und formen sich in Stäbchen von ansehnlicher Länge um (Taf. VIII, Fig. 3 i, k). Damit ist das Keimungsstadium des *Azotobacter* beendet und er tritt in das vegetative Stadium seines Lebens ein.

Die vegetativen Formen des *Azotobacter* können jedoch nicht nur aus den eigentlichen Sporen, sondern auch aus den Vorstadien derselben, d. h. aus den sporulierenden Kokken entwickelt werden. Bringt man Gallertkolonien mit Kokken aus einer alten Kultur (ich habe dazu Gallertkolonien von der Oberfläche der Nährlösung einer 2—3 Wochen alten Kultur verwendet, deren Hauptvegetation längst abgeschlossen war, in welcher aber kleine Gallertkolonien an der Oberfläche als „Nachzügler“ der Hauptvegetation noch wochenlang erschienen) in frische Nährlösung in die feuchte Kammer, so sieht man, wie die Kokken nach etwa 2—3 Stunden ihre Hüllen



durchbrechen und nach außen treten (Taf. VIII, Fig. 4 b). Der Vorgang spielt sich in der Weise ab, daß die äußeren Schleimhüllen aufgelöst werden, während die innere, den Kokkus unmittelbar umhüllende, derbere und in unserem Falle doppelt konturierte Membran zum Teil resorbiert, zum anderen Teil wohl gesprengt wird, so daß eine weit klaffende Öffnung entsteht, durch welche der Kokkus herausschlüpft. Die entleerte Hülle zeigt eine napf- oder fingerhutförmige Gestalt und doppelte Umrisse. Der junge Keimling zeigt die gleiche Form und die gleiche Struktur, wie der aus der Spore herausgeschlüpfte; er entwickelt sich auch genau in derselben Weise, wie der letztere, in der drittnächsten Generation zum vegetativen Langstäbchen (Taf. VIII, Fig. 4 d, e und deren Erklärung).

Es unterliegt keinem Zweifel, daß auch Krzemieniewski die Keimung solcher noch nicht in Dauersporen umgewandelten Kokken gesehen und in den Textfiguren seiner Abhandlung abgebildet hat (14, S. 940, Fig. 1), doch hat er übersehen, daß der Keimling nicht als Stäbchen, sondern als Kokkus aus der Sporenhaut entschlüpft.

Aus diesen Beobachtungen darf geschlossen werden, daß ein prinzipieller Unterschied zwischen den sporulierenden Kokken und den eigentlichen Dauersporen nicht besteht; vielmehr sind beide Formen nur als verschiedene Entwicklungsstufen einer in morphologischer und physiologischer Beziehung gleichwertigen, einheitlichen Form zu betrachten. Im zweiten Teil dieser Arbeit werde ich auch den Beweis erbringen, daß *A. chroococcum* unter Umständen die Fähigkeit der Sporenbildung *sensu strictiore* einbüßt, d. h. daß er die Fähigkeit verliert, im Fruktifikationsstadium Schutzmembranen um die Kokken auszubilden. Dadurch wird aber weder der morphologische Charakter der Kokkusformen, noch deren biologische und physiologische Rolle alteriert; sie bleiben trotzdem als besondere Fortpflanzungsorgane — nur von geringerer Widerstandsfähigkeit gegen äußere schädliche Einflüsse — bestehen und sind als End- und Ruhestadien der vegetativen Propagation zu betrachten, wie dies im nächsten Kapitel noch näher begründet werden soll.

Die Involutionsformen. Die Mannigfaltigkeit in der äußeren Gestalt der Azotobacterzellen, die wir schon im normalen Entwicklungsgange und bei günstigen Lebensbedingungen beobachten, äußert sich in noch höherem Grade unter ungünstigen Lebensverhältnissen. Es entstehen dann ganz bizarre und eigen-



tümliche Formen und Gestalten, deren Zugehörigkeit zu *Azotobacter* Zweifel erregen könnte, wenn nicht durch direkte Beobachtungen und Kontrollversuche erwiesen werden könnte, daß man mit demselben Organismus zu tun hat. Die Zahl dieser als Involutions- oder Degenerationserscheinungen aufzufassenden Formen ist eine Legion; mehrere von ihnen wurden schon von anderen Forschern beobachtet und beschrieben. Er wäre vergebliche Mühe und fruchtlose Arbeit, alle diese Formen hier anzuführen und zu beschreiben; es genügt, wenn ich die am meisten charakteristischen, ferner diejenigen Formen registriere, welche entweder zu falschen Deutungen und Hypothesen Veranlassung gaben oder vom morphologischen und physiologischen Standpunkte besonders interessant erscheinen.

Sämtliche morphologische Entwicklungsphasen des *Azotobacter* bilden unter ungünstigen Lebensverhältnissen ihre besonderen Involutionsformen aus, die je nach dem Nährboden und den sonstigen Bedingungen mehr oder weniger voneinander differieren, aber in ihrem äußeren Habitus und ihrer inneren Struktur die Grundform, aus der sie sich entwickelt haben, erkennen lassen. Wir wollen demnach unsere Revue der Involutionsformen auf Grund der normalen Entwicklungsformen basieren.

Im allgemeinen beginnen die Involutionserscheinungen mit gewissen Veränderungen in der inneren Struktur der Zelle und Umformung der Zellbestandteile, wobei die äußere Form der Zellen anfangs unverändert bleibt; sie liegen demnach in diesem Stadium auf cytologischem Gebiet und es soll darüber im nächsten Kapitel das Wichtigste berichtet werden. An dieser Stelle mag nur hervorgehoben werden, daß in den meisten Fällen die Erscheinungen einer beginnenden Degenerationen mit der Vakuolisierung des Zellinhalts ihren Anfang nehmen. Im normalen Lebenslauf der Zelle sind im Zellinhalt entweder gar keine oder nur vereinzelte und kleine Vakuolen zu sehen; wird jedoch der normale Zustand durch Mangel oder Überfluß an gewissen Lebensfaktoren gestört, dann erscheinen im Zellinhalt zahlreiche und große Vakuolen, welche öfters zu einer großen, das ganze Zelllumen ausfüllenden Vakuole zusammenfließen und das normale Lebensbild der Zelle ganz verändern. Eine zweite Erscheinung der beginnenden Desorganisation beruht auf der Vermehrung der lichtbrechenden, chromatischen Einschlüsse des Protoplasten, wodurch die Zelle ein stark körniges Aussehen erhält.



Diese chromatischen Zellkernelemente sind anfangs von derselben Beschaffenheit wie in normalen Zellen; später erleiden sie gewisse stoffliche Veränderungen und reagieren nicht mehr auf Farbstoffe und andere Reagenzien in der gewöhnlichen Weise. Sobald diese stofflichen Veränderungen sich vollzogen haben, ist die Zelle ganz abgestorben und nicht mehr entwicklungsfähig. Gewöhnlich, wenn auch nicht immer, geht mit diesen stofflichen Veränderungen des Zellinhalts eine Umgestaltung der äußeren Form der Zellen Hand in Hand.

Nach diesen allgemeinen Bemerkungen gehe ich zur Skizzierung der verschiedenen Involutionsgestalten über und beginne mit den vegetativen Stadien. Im einfachsten Falle stellen die vegetativen Stäbchen ihre Teilungen ein und wachsen zu Riesenstäbchen (Riesen-Diplokokken oder richtiger gesagt: „Riesen-Doppelstäbchen“ Beijerinck's) oder auch zu langen Fäden heran, die sich mit größeren und kleineren Körnern erfüllen, bei größerer Anhäufung sich zu wirren Knäueln, verflechten und nach längerer Zeit entweder in Auflösung übergehen oder auch erhalten bleiben; im letzteren Falle schwellen die Stäbchen und auch kürzere Fäden an irgend welcher Stelle mehr oder weniger, zuweilen sogar kugelförmig an und gewähren alsdann das Bild einer an zwei entgegengesetzten Enden keimenden Pilzspore. Fig. 5, Taf. VIII, veranschaulicht einige solcher Bilder. Die zu Fäden ausgewachsenen Stäbchen erreichen zuweilen eine sehr bedeutende Länge von 80  $\mu$  und mehr und sind in ihrem Verlaufe bald gleichmäßig dick und den Fäden irgend eines *Bacillus* ähnlich oder bilden blasige Anschwellungen und Ausstülpungen, biegen sich knieförmig um, wodurch die bizarrsten Bilder entstehen (Fig. 6, Taf. VIII). In anderen Fällen bleiben die Stäbchen kurz und verändern nur ihre Form, indem sie sich schraubenförmig krümmen und zu wurstförmigen Gebilden gestalten (Fig. 6, Taf. VIII). An solchen wurstförmigen Formen habe ich Aussprossungen des Plasmas aus den Zellen beobachtet in der Art, wie dies von Hiltner (26) für die Bakteroiden der Leguminosenknöllchen in Traubenzuckerlösungen u. dgl. beschrieben wird (Fig. 6 z, Taf. VIII). Ich bemerke, daß diese Aussprossungen nur an stark desorganisierten Zellen beobachtet werden, die zuweilen schon nach Übertragung in reines Wasser, sonst aber nach Zusatz von schwach alkalischen Reagenzien und basischen Farbstoffen verquellen und sich ganz auflösen.



Die Kokkenformen zeigen zwar andere Involutionsgestalten, aber die inneren Vorgänge im Zelleibe der absterbenden Individuen bleiben, im Grunde genommen, die gleichen. Auch hier beginnt der Prozeß mit der Vakuolisierung des Zellinhalts und Vermehrung der chromatischen Zelleinschlüsse und endet mit deren stofflicher Umänderung. Die jungen Kokken, welche soeben aus den Kurzstäbchen durch Verschleimung der Mutterzellmembranen entstanden sind, versuchen zwar sich mit den schützenden Schleimhüllen zu umgeben, aber sie kommen nicht zur Ausbildung von Gallertkolonien, ihre Schleimhüllen bleiben äußerst zart und lose und kollabieren bei Behandlung mit Farblösungen und Reagenzien, schrumpfen stark zusammen, wodurch die Zellen ein unregelmäßig eckiges Aussehen gewinnen. Trotzdem wachsen die Zellen weiter, füllen sich mit zahlreichen lichtbrechenden Körnchen, die mit dem Wachstum der Zelle immer größer werden (S. Fig. 7 A, Taf. VIII, und deren Erklärung). Diese Erscheinungen hat wohl Heinze (27) zuerst beobachtet und die fraglichen Gebilde als Sporangien mit endogenen Sporen gedeutet; in Wirklichkeit sind es absterbende oder abgestorbene, nicht weiter entwicklungsfähige Riesenzellen der Kokkuszustände. Solche Umänderungen können selbst junge Gallertkolonien erleiden, indem die in denselben eingeschlossenen Kokken sich vergrößern, mit lichtbrechenden Körperchen füllen und nach und nach den ganzen Innenraum der Gallerthülle einnehmen; letztere bleibt oft noch lange Zeit als äußere, mehr oder weniger schleimige Hülle um solche „Riesenzellen“ erhalten (Fig. 7 B, Taf. VIII). In anderen Fällen löst sich der körnige Inhalt der Kokken vollständig auf oder es kommt gar nicht zur Differenzierung desselben, vielmehr erscheint von Anfang an im Zellumen eine große Vakuole, die allmählich fast das ganze Zellumen ausfüllt, während das Cytoplasma mit seinen chromatischen Bestandteilen einseitig an die Peripherie verdrängt wird und noch einige Zeit als schmaler, lichtbrechender, halbmondförmiger Streifen zu sehen ist, um mit weiterem Wachstum der aufgeblasenen Zelle vollständig zu verschwinden. Solche blasig angeschwollenen Zellen zeigen die Neigung, an ihrer Peripherie kleinere blasige Anschwellungen zu bilden und täuschen dann „sprossende Hefezellen“ vor (Taf. VIII, Fig. 7 C).

Auch Sporen, die mit einer derben, doppelt konturierten Membran umgeben sind, unterliegen öfters Degenerationserscheinungen.



In solchen absterbenden Sporen verschwinden zuerst die chromatischen Körnchen, später auch das Plasma und die ganze Spore wird mit einer stark lichtbrechenden, weißen oder gelblichen Masse von klumpigem Aussehen ausgefüllt, die sich weder mit Anilinfarben noch mit Jodjodkalium färben läßt und auch gegen Alkalien und Säuren resistent zeigt. Die auf diese Weise degenerierten Sporen sind nicht mehr keimfähig.

Auf die stofflichen Veränderungen, welche die einzelnen Inhaltsbestandteile der absterbenden Zellen erleiden, werde ich noch im nächsten Kapitel zu sprechen kommen.

Die Regenerationsformen. Mit diesem Namen belege ich diejenigen Lebensformen des *A. chroococcum*, die aus bestimmten geformten Inhaltsbestandteilen der absterbenden Individuen ausgestoßen oder auch, im Innern derselben verbleibend, sich zu neuen Azotobacter-Individuen und -Generationen — selbst in demselben Nährmedium — entwickeln. Ich habe schon in meiner vorläufigen Mitteilung (22, S. 522) die Tatsache festgestellt, daß vegetative Stäbchen kurz vor ihrem Absterben kleine, lichtbrechende Körperchen nach außen ausstoßen, und auf Grund vereinzelter, direkter Beobachtungen es als sehr wahrscheinlich hingestellt, daß diese Körperchen sich unter Umständen zu neuen Individuen weiter entwickeln können. Das Tatsächliche der Erscheinung selbst: die Ausstoßung dieser Körperchen aus den lebenden Zellen, kann übrigens durch jeden präparativen Eingriff, welcher zur Abtötung der Zellen führt, hervorgerufen und sichergestellt werden; man braucht nur zur lebendigen und kräftig wachsenden Azotobacterkultur eine kleine Menge irgend einer Farblösung zuzusetzen, um an der Peripherie der gefärbten und abgestorbenen Zellen stark gefärbte Körnchen zu sehen, welche bald ganz außerhalb der Zelle liegen, bald noch teilweise in der äußeren Membran stecken. Die Erscheinung der Ausstoßung dieser Körnchen durch Azotobacter hat übrigens schon früher Em. Mencl (11) beobachtet und bemerkt hiezu, „daß ihm die Bedeutung dieser Erscheinung ganz dunkel geblieben ist“. Auch bei anderen Bakterien wurde Ähnliches beobachtet. So berichtet Winogradsky (28) von seinem *Clostridium Pastorianum*, daß er bei dieser Bakterie unter gewissen Kulturbedingungen „die Abschnürung von kleinen kokkenartigen Gebilden“ beobachtet hat, und meint, daß dieselben „nicht mehr entwicklungsfähig sind“ — und diese Beobachtung wurde später



von Benecke und Keutner (8) bestätigt. Es scheint demnach, daß dieser Vorgang nicht bloß auf *Azotobacter* beschränkt ist, sondern auch bei anderen Bakterien vorkommt.

Was meine eigenen Beobachtungen betrifft, so habe ich schon (a. a. O., S. 523) auf Grund direkter Beobachtungen in Tropfenkulturen feststellen können, daß diese Körperchen entwicklungs-fähig sind, indem sie sich vergrößern und durch Teilungen zu winzigen Diplokokken auswachsen und sich dann durch weitere Teilungen vermehren. Da ich in derselben Tropfenkultur an denselben winzigen Kokkenzellen, nachdem sie sich weiter vergrößert haben, dieselben Strukturen fand, wie an den normalen *Azotobacter*zellen, so gab ich der Meinung Ausdruck, daß in diesen Erscheinungen eine Art der Erhaltung des Lebens unter Bedingungen vorliegt, welche auf die normal entwickelten Lebensformen schon abtötend wirkt. Leider konnte ich diese Erscheinungen, wie ich es beabsichtigte, bis jetzt nicht weiter verfolgen können, um auf Grund von unmittelbaren Beobachtungen und entsprechenden Versuchen zu beweisen, daß dies wirklich der Fall ist. Inzwischen ist es mir geglückt, auf einem anderen Wege in den Besitz eines unwiderlegbaren Beweises zu gelangen, daß absterbende *Azotobacter*zellen durch bestimmte Inhaltsbestandteile des Zelleibes regeneriert werden und daß die so entstandenen Regenerationsformen sich zu normalen Lebensformen weiterentwickeln. Ich habe schon oben im Kapitel über allgemeine Morphologie berichtet, daß manche Kulturen in Nährlösungen behufs Aeration geschüttelt wurden. Zufolge des mechanischen Aufstoßens der Flüssigkeit an die Glaswand wurde eine Anzahl von Stäbchen in solchen Kulturen abgetötet, was an dem veränderten Aussehen solcher Stäbchen sich bemerkbar machte. Mehrere dieser Stäbchen gingen unter Strukturveränderungen und Zersetzungserscheinungen einfach zugrunde, in anderen dagegen entwickelten sich im Innern der Zellen aus bestimmten Zellelementen ganz winzige und größere bis normal große neue *Azotobacter*zellen. Fig. 6 *a—c*, Taf. IX, zeigt einige der in diesem Stadium schon abgestorbenen Mutterstäbchen mit den in denselben neu entstandenen regenerativen Mikroformen. Besonders instruktiv und überzeugend ist das in *a* dargestellte Bild. Man sieht in dem abgestorbenen und z. T. dem Zerfall anheimfallenden Stäbchen neben dem veränderten Zellkern (*z*) zwei kleine Diplokokken (*d*) und ein größeres, in Teilung begriffenes Stäbchen (*v*), außerdem an den



beiden Polen je einen Kokkus (*k*) von fast normaler Größe, von denen der obere (*s*) die für normale Sporen charakteristische Struktur zeigt, jedoch keine chromatischen Einschlüsse besitzt. Das zweite Stäbchen *b* derselben Figur enthält ein Kurzstäbchen von normaler Größe, das dritte *c* sporulierende Kokken mit chromatischen Einschlüssen. In Fig. 7, Taf. IX, ist in *a* eine längere Kette von Mikro-Azotobacterkokken und daneben auch kürzere Verbände solcher Kokken, jedoch schon weiter entwickelt und größer, aus derselben Kultur abgebildet; in *b* sind schließlich zwei Kokken von normaler Größe aus derselben Kultur aufgenommen, um die Größenunterschiede zwischen den „Mikroformen“ und den normalen Formen zu veranschaulichen. Auch in zahlreichen anderen, selbst nicht geschüttelten Kulturen, habe ich sowohl in Nährlösungen als auch auf Agarnährböden Mikro-Azotobakterformen, immer aber nur unter weniger günstigen Lebensbedingungen, in größerer oder geringerer Anzahl gefunden. Übrigens sind diese Mikroformen schon von älteren Forschern gewiß öfters beobachtet worden, wie aus deren Angaben geschlossen werden muß, daß in Azotobakterkulturen neben den normalen Zellen, zuweilen auch sehr kleine, von kaum 1  $\mu$  oder noch weniger Durchmesser vorkommen.

## V. Spezielle Cytologie.

Mit diesem Kapitel komme ich auf ein sehr weites, häufig betretenes, aber auch viel umstrittenes Gebiet. Ob Bakterien Zellkerne oder wenigstens Zellelemente haben, welche morphologisch und physiologisch den Zellkernen höherer Pflanzen und Tiere gleichzustellen wären, ist eine Frage, welche seit etwa zwanzig Jahren zahlreiche Bakteriologen und Protistologen beschäftigt und zu vielen Kontroversen Veranlassung gab. Während die einen behaupten, daß Bakterien einen echten Zellkern besitzen und dessen Existenz durch verschiedene Tinktionsbilder zu beweisen suchen, wird von anderer Seite diesen Bildern jede Beweiskraft abgesprochen und darauf hingewiesen, daß im Bakterienleibe auch andere tingierbare Elemente vorkommen, die als Reservestoffe und dgl. anzusprechen sind. Bei vielen Bakterien hat man aber nach geformten Elementen, welche als Zellkerne gedeutet werden könnten, vergebens gesucht — und für diese Bakterien nimmt man an, daß die Kernsubstanz derselben im Zellplasma diffus verteilt ist. Überzeugende



und einwandfreie Beweise für oder gegen die Existenz von Zellkern oder Zellkernäquivalenten bei Bakterien werden jedoch von keiner Seite geliefert, da sämtliche Untersuchungen sich entweder auf totes und durch präparative Eingriffe mehr oder weniger verändertes Material beziehen, oder bei vitaler Färbung nur einzelne Teilungsphasen der vermeintlichen Zellkerne ohne Zusammenhang mit den übrigen Lebensprozessen der Zelle und mit deren Teilungen zur Anschauung bringen. Aus diesem Grunde habe ich mir zur Aufgabe gestellt, beim Studium des morphologischen Entwicklungsganges der Azotobacterzelle auch die cytologischen Vorgänge in der Zelle selbst zu verfolgen. Inwieweit es mir gelungen ist, die sich darbietenden Erscheinungen richtig zu erfassen und zu deuten, überlasse ich anderen zu beurteilen; ich will mich möglichst auf objektive Darstellung dieser Erscheinungen beschränken und dieselben ohne Rücksicht auf die bestehenden Anschauungen und Theorien so deuten, wie dies aus der Aufeinanderfolge der Erscheinungen und den übrigen Lebensvorgängen in der Zelle selbst mir am natürlichsten erscheint. Doch zuvor seien mir einige Worte über die angewandten Untersuchungsmethoden gestattet.

Methodik. Meine cytologischen Untersuchungen habe ich in erster Linie an lebendem Material, welches in den verschiedenen Entwicklungsphasen in feuchter Kammer direkt und ununterbrochen beobachtet wurde, ausgeführt. Die so gewonnenen Beobachtungen wurden alsdann zum Teil an demselben der fraglichen Tropfenkultur der feuchten Kammer entnommenen Material, zum anderen Teil an dem aus parallel und mit gleichen Nährlösungen beschickten Kulturen im großen stammenden Material durch verschiedene Tinktionen kontrolliert. In letzterem Falle, d. h. bei Entnahme des Materials aus Kulturkolben, wurde darauf geachtet, daß die betreffende Vegetation sich möglichst in gleichem Entwicklungsstadium befinde. Ich bediente mich mit Vorliebe der vitalen Färbung, weil dieselbe bei Anwendung von verdünnten Farblösungen die Zellstrukturen am wenigsten angreift oder sogar ganz intakt läßt. Zu diesem Behufe kamen in Anwendung: verdünnte Methylenblaulösung (1:10 oder 1:20—30), alkalische oder sogen. polychrome Methylenblaulösung und eine Mischung von verdünnter wässriger Methylgrünlösung mit Fuchsin. Namentlich diese letztere Farblösung leistete vorzügliche Dienste; sie färbt nämlich sicher und differenziert gleichzeitig die einzelnen Zellbestandteile und, in



entsprechender Verdünnung angewandt, läßt sie die Bakterien noch stundenlang am Leben, wobei auch die Schwärmfähigkeit der Zellen erhalten bleibt. Ein weiterer Vorzug dieser Farblösung besteht darin, daß sie sämtliche färbbaren Zellelemente in den verschiedenen Entwicklungsstadien in einer für das betreffende Stadium charakteristischen Weise färbt, so daß aus der Intensität der Färbung und dem resultierenden Farbenton auf den Entwicklungs- und sonstigen Zustand der Zelle geschlossen werden kann; vorsichtig angewendet, läßt sie auch die Zellstrukturen ganz intakt.

Außer der vitalen Färbung sind auch verschiedene Färbungsmethoden mit fixiertem Material in Anwendung gekommen. Zur Fixierung wurden zumeist die mit angewärmtem Leitungswasser verdünnten Ausstrichpräparate angefertigt, dann in einem geschlossenen Glaskasten bei gewöhnlicher Temperatur an der Luft getrocknet, um nach Verdunstung des Wassers in einen auf 37—40° C. angewärmten Thermostaten für eine halbe bis ganze Stunde gestellt zu werden. So behandelte Ausstrichpräparate, die, beiläufig bemerkt, die Zellstrukturen fast unverändert zeigten, wurden alsdann entweder mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain oder nach der von Raýman und Kruis (29) angegebenen Methode mit Alizarin PS (hexaoxyanthrachinondisulfonsaures oder purpurinsulfonsaures Ammoniumsalz der Fabrik Beyer & Co. in Elberfeld) gefärbt und schließlich mit Eisenalaun regressiv differenziert. Beide Alizarin-farbstoffe erwiesen sich als gleichwertig. Die Methode von Raýman und Kruis hat im allgemeinen bessere Resultate als Heidenhain's Eisenhämatoxylin, zuweilen sogar sehr schöne und instruktive Bilder gegeben, aber auch sie bietet gegenüber der vitalen Färbung mit Fuchsin-Methylgrünlösung nur den einzigen Vorteil, daß die Präparate, in Kanadabalsam eingelegt, sich besser halten, dagegen den großen Nachteil, daß viele Präparate bei der Entfärbung auch bei vorsichtiger Behandlung verderben und die Strukturen mehr oder weniger verwischt werden. Die in der angegebenen Weise angefertigten Ausstrichpräparate wurden auch zur Färbung nach Löffler's Methode mit Tannin-Eisenvitriolbeize und Anilin-fuchsinlösung verwendet und es zeigte sich, daß diese Methode, entsprechend modifiziert, auch zur Fixierung der Zellstrukturen vom Azotobacter mit Vorteil angewendet werden kann. Schließlich kam auch Gram's Methode der Doppelfärbung in Anwendung, doch konnten damit nur für Sporenzustände brauchbare Präparate erzielt werden.



Von den sonstigen Fixierungsmitteln verwendete ich Osmiumtetraoxyd in verdünnter Lösung und Osmiumsäuredämpfe sowie Sublimat in physiologischer Kochsalzlösung. Die mit Osmiumsäure fixierten Präparate ließen stets sehr weitgehende Strukturveränderungen in den Zellen erkennen, weshalb diese Art der Fixierung aufgegeben werden mußte. Bessere Resultate erzielte ich bei Fixierung mit Sublimat und nachheriger Färbung mit Giemsa-Farbstoff; doch waren die so erhaltenen Bilder wenig instruktiv, vielleicht aus dem Grunde, weil der in Anwendung gekommene Farbstoff vielleicht zu alt und wohl auch zum Teil zersetzt war.

Sämtliche bis jetzt besprochenen Fixierungs- und Färbungsmethoden dienten zum Nachweis der Zellstrukturen und der chromatischen Zellelemente sowie zur Kontrolle der an lebenden, ungefärbten Zellen nach dieser Richtung hin beobachteten Erscheinungen.

Das etwaige Vorkommen von sonstigen Zelleinschlüssen, wie Glykogen, Fett, Volutin u. dgl., wurde mit den in der Mikrochemie üblichen Reagenzien nach den gewöhnlichen Methoden geprüft.

Im folgenden werde ich die Ergebnisse meiner cytologischen Untersuchungen an Hand der uns schon bekannten morphologischen Entwicklungsgeschichte des *Azotobacter* zu schildern versuchen.

Zellkerne und Zellkernäquivalente. Im morphologischen Teil dieser Abhandlung wurde gezeigt, daß *A. chroococcum* in allen seinen Entwicklungsphasen: vegetative Stäbchen, fruktifikative Kokken und Dauersporen in zwei voneinander typisch verschiedenen Modifikationen auftritt. Die eine dieser Modifikationen, welche durch körnige Beschaffenheit des Zellinhalts und schwache Färbbarkeit des Protoplasten charakterisiert ist, haben wir als „Normalform“ bezeichnet, denn sie tritt unter günstigen und in diesem Sinne als normal zu bezeichnenden Lebensverhältnissen als die einzige oder wenigstens derart vorherrschende Form auf, daß die zuweilen in älteren Kulturen auftretende zweite Modifikation ganz in den Hintergrund gedrängt wird. Die zweite Modifikation, die als „Anpassungsform“ bezeichnet wurde, ist durch den Mangel an körnigen Zellelementen des Inhalts und die starke Färbbarkeit des Protoplasten gekennzeichnet. Es braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden und es ergibt sich dies schon aus der weiter oben gegebenen Darstellung der morphologischen Entwicklung, daß zwischen diesen beiden typischen Formen, — wie es bei einem der-



maßen variablen Organismus, wie es *A. chroococcum* ist, nicht anders erwartet werden kann, — auch Übergangsformen geben muß und gibt. Auch gehen die Formen des zweiten Typus, namentlich im fruktifikativen Stadium, wenn sie sich unter dem direkten Einfluß der Luft entwickeln, gewöhnlich in die Formen des ersten Typus über, während umgekehrt die vegetativen Normalformen des ersten Typus, namentlich bei gehindertem Luftzutritt und in der Tiefe der Nährlösungen in den zweiten Typus umschlagen. Worauf dieser Unterschied zwischen den beiden Typen beruht, werden wir begreiflich finden, wenn wir die cytologischen Vorgänge in den Zellen selbst während der einzelnen Entwicklungsphasen näher verfolgen.

Fassen wir zunächst die Vorgänge bei der Sporenkeimung ins Auge. Wir haben gesehen, daß der anfangs homogene, fein netzartige Inhalt der Sporen bei beginnender Keimung sich trübt, indem im Sporeninhalte stärker lichtbrechende halbmondförmige Flecke erscheinen, die mit ihren bogenförmigen Armen gegen die Mitte der Zelle gerichtet sind, immer näher aneinanderrücken und schließlich zu einem zentralen glänzenden Korn zusammenfließen (Fig. 3, Taf. VIII). Behandelt man keimende Sporen mit Kernfarbstoffen (Hämatoxylin, Methylgrün, Alizarin PS., Methylblau usw.) mittels der oben angegebenen Färbungsmethoden, so überzeugt man sich, daß die lichtbrechenden Flecke aus Chromatinsubstanz bestehen, die sich bei beginnender Keimung aus dem Cytoplasma herausdifferenzierte. Sie färben sich mit den genannten Farbstoffen intensiv blau bis violett und fast schwarz und erscheinen bei starken Vergrößerungen und an nicht zu stark gefärbten Präparaten aus winzigen Körnchen, zwischen welchen auch größere eingestreut sind, zusammengesetzt. Sehr schöne und instruktive Bilder liefert die Färbemethode von Raýman und Kruis, weil sie auch den übrigen Inhalt der Spore differenzial färbt. In den mit dieser Methode gefärbten Präparaten sind die Chromatinkörnchen dunkelblau gefärbt, während das umgebende Cytoplasma sich blaßrosa färbt, wobei man bemerkt, daß das Cytoplasma schon in diesem Entwicklungsstadium aus zwei Partien besteht: einer zentralen, etwas dunkler gefärbten, in welcher die Chromatinkörnchen liegen, und aus einer schmalen, peripherisch unmittelbar der Sporenmembran anliegenden Zone, die etwas heller erscheint und die wohl die künftige Membran des jungen Keimlings darstellt.



Haben die Chromatinmassen sich zu einem zentralen lichtbrechenden Korn vereinigt, dann ändert sich das Bild insoweit, als das lichtbrechende Körperchen nicht mehr frei im Cytoplasma liegt, sondern in einer sich nicht färbenden homogenen Grundsubstanz eingebettet ist, die nach außen von einer feinen Haut umgeben ist. Das so entstandene kugelige Gebilde ist der Zellkern, welcher auf die beschriebene Art und Weise sich aus dem Cytoplasma herausdifferenziert hat. Man kann an ihm drei sich färberisch und in bezug auf Lichtbrechungsvermögen different verhaltende Substanzen unterscheiden. Im Zentrum liegt die zumeist homogene, unter Umständen auch äußerst fein granulirte, stark glänzende und zu einem kleinen Kügelchen zusammengeballte Chromatinmasse; diese ist von einer homogenen und Farbstoffen gegenüber indifferenten Substanz von schwachem Lichtbrechungsvermögen, der Kerngrundsubstanz umgeben und wird nach außen von einer dichteren Schicht derselben, der Kernhautschicht begrenzt (Taf. IX, Fig. 1). Daß dieses Gebilde tatsächlich ein Zellkern ist, beweist der Umstand, daß es sich in der für Zellkerne der Hefezellen charakteristischen, von Kohl (30) und Guilliermond (31) beschriebenen Weise zuerst in zwei, dann in vier Tochterkerne teilt und daß die Auskeimung der Spore nicht eher eintritt, bis diese Teilungen vollzogen sind. Doch habe ich die Teilungen des Zellkerns in den keimenden Sporen in allen Phasen und Einzelheiten nicht verfolgen können, weil die Azotobakterzellen in diesem Lebensstadium gegen starkes Licht sehr empfindlich sind und bei längerer intensiver Beleuchtung desorganisieren und absterben. Aus diesem Grunde hatte ich auch große Mühe und Schwierigkeiten, bis es mir endlich gelang, den ganzen Keimungsprozeß lückenlos zu erforschen. Es unterliegt aber wohl keinem Zweifel, daß die Zellkernteilungen in den Sporen sich in derselben Weise vollziehen, wie dies für die vegetativen Zustände weiter unten beschrieben werden soll, da hier und dort die Zellkernstrukturen die gleichen sind.

Die jungen Azotobakterkeimlinge erhalten somit vier aus den Teilungen des Zellkerns hervorgegangene chromatische Körnchen und keimen auch mit dieser Zahl von Körnchen aus. Die Vierzahl dieser Gebilde wiederholt sich auch in einem späteren Entwicklungsstadium in den sporulierenden Kokkenzellen und ist als normal für unseren Mikroben anzusehen. In sporulierenden Zellen sieht man zwar öfters mehr als vier chromatische Körnchen, zuweilen



sogar sehr viele, aber solche Zellen zeigen degenerative Erscheinungen und sind als krankhafte oder Involutionsformen zu betrachten. Freilich muß ich es unentschieden lassen, ob wir in den beiden als normal bezeichneten Fällen, nämlich in den Keimlings- und sporulierenden Zellen, mit vier besonderen, individualisierten Zellkernen oder vielmehr nur mit Chromatinteilen eines einzelnen Zellkerns zu tun haben. Für die letztere Ansicht würden namentlich zwei Umstände sprechen: erstens, daß es mir nie gelungen ist, einen die Chromatinmasse der vier lichtbrechenden Körnchen umgebenden „hellen Hof“ nachzuweisen, woraus gefolgert werden kann, daß die übrigen Bestandteile des Zellkerns, die Grundsubstanz und die Hautschicht ihnen fehlen; zweitens, daß die Chromatinkörnchen, die stets eine peripherische Lage einnehmen, durch ein feines Netz von Fäden miteinander verbunden sind, wodurch die Zelle eine wabenartige oder, um den von Blütschli eingeführten *terminus technicus* zu gebrauchen, eine alveoläre Struktur erlangt. Andererseits ist zu bemerken, daß, wenn in den keimenden Sporen oder in sporulierenden Kokken bloß ein oder zwei Chromatinkügelchen vorhanden sind, dieselben zumeist mit einem „hellen Hof“ von Grundsubstanz und Hautschicht umgeben sind. Gegen diese Ansicht könnte nur der Umstand sprechen, daß die vier Chromatinkügelchen nach dem Ausschlüpfen des Keimlings sich noch einmal teilen und in acht Körnchen zerfallen, doch ist dieser Einwand nicht von Belang, da wir ja wissen, daß bei den Protozoen die sogen. Chromidien, die ja nichts Anderes als Chromatinteile des Zellkerns sind, sich durch Teilungen vermehren.

Halten wir an der Anschauung fest, daß in den keimenden Sporen der individuelle Zellkern sich in vier Chromidien auflöst, so wären schon in den Anfangsstadien der Entwicklung des Azotobacter vom cytologischen Standpunkte aus drei in bezug auf die Kernverhältnisse verschiedene Zustände zu unterscheiden: 1) ein diffuses Stadium, in welchem die Kernsubstanz diffus im Zellplasma verteilt ist und vom individualisierten Zellkern oder von geformten Kernelementen in der Regel nichts zu sehen ist<sup>1)</sup>; 2) ein

<sup>1)</sup> Es kommen jedoch auch Ausnahmen von dieser Regel vor, wie dies Fig. 5 xy, Taf. VII, veranschaulicht. In alten, mit Fuchsin-Methylgrün gefärbten Präparaten von vegetativen Stäbchen des zweiten Typus, d. h. mit diffus verteilter Kernsubstanz, sieht man öfters neben unregelmäßig geformten Klumpen von in-



alveoläres Stadium, welches mit dem von Blütschli als „Zentralkörper“ bezeichneten sich zum Teil deckt und durch Auftreten von geformten, als Chromidien zu bezeichnenden Kernbestandteilen charakterisiert ist; 3) ein Stadium mit individualisiertem Zellkern. Für die beiden ersten Zustände, wo der Zellkern mit dem Plasma mehr oder weniger vermengt ist, würde ich den schon in meiner vorläufigen Mitteilung gebrauchten Namen „Kernzellen“ oder „Nuklearzellen“ vorschlagen, um eine kurze und zutreffende Bezeichnung für diese Zustände zu haben; das an erster Stelle genannte Stadium könnte als „diffuse Kernzelle“, das zweite Stadium als „alveoläre Kernzelle“ bezeichnet werden. Ich werde auf diese Zellkernverhältnisse noch weiter unten zurückkommen.

Kehren wir jetzt zu unserem Ausgangspunkt zurück und betrachten den Keimungsprozeß in Sporen, in welchen die Kernsubstanz nicht diffus verteilt, sondern in Körnchen auftritt, so fällt hier die Herausbildung des Zellkerns weg, da ein diffuser Zustand der Kernsubstanz nicht vorhanden und der Zellkern in der Ein- oder Zwei- bis Vierzahl schon vorgebildet ist. Das in den Sporen dieses Typus in Form von kleinen Tröpfchen angesammelte Glykogen wird während des Keimungsprozesses aufgelöst und wohl zum größten Teil verbraucht, da die ausgekeimten Azotobacterzellen keine Glykogenreaktion mehr geben.

Der individuelle Zellkern kommt wieder zum Vorschein, sobald die jungen Keimlinge zu vegetativen Stäbchenformen ausgewachsen sind. Er liegt bald in der Mitte der Zelle, bald einem der Pole näher und wenn eine Vakuole vorhanden ist, was aber nicht immer der Fall ist, in unmittelbarer Nähe derselben (Fig. 1 und 2, Taf. IX). In jungen, kräftig wachsenden Kulturen ist er besonders groß und hebt sich vom umgebenden Plasma als ein besonderes Zellorgan scharf ab; er zeigt dann sehr präzis die schon oben beschriebenen Strukturen. Gegen Farbstoffe ist er sehr resistent und nimmt dieselben erst nach dem Absterben der Zelle auf; einmal aufgenommen, hält er sie aber fest und läßt sich nicht leicht entfärben. Seine Teilungen habe ich zu wiederholten Malen in Tropfenkulturen di-

tensiv gefärbter Chromatinsubstanz auch individualisierte Zellkerne in Einzahl auftreten, während in den ersten Stunden nach der Färbung davon nichts zu sehen ist und der ganze Inhalt der Zelle sich gleichmäßig färbt.



rekt beobachtet. Die Teilungen gehen in der Weise vor sich, daß die zentrale Chromatinmasse sich vergrößert und in die Länge zieht; dann entsteht in der Mitte der länglichen Masse eine Einschnürung; die beiden durch die Einschnürung getrennten Teile rücken voneinander und runden sich ab, bleiben jedoch noch eine Zeitlang durch einen dünnen, oft geschlängelten Chromatinfaden miteinander verbunden; es entstehen so hantelförmige Figuren, die lebhaft an die von Guilliermond (31/2) beschriebenen Details der Zellkernteilung bei Hefezellen erinnern (Fig. 3 u. 4, Taf. IX). Schließlich reißt der verbindende Chromatinfaden ab und die neu entstandenen Tochterkerne liegen an den Polen der inzwischen ebenfalls vergrößerten und tonnenförmig verlängerten Grundsubstanz einander gegenüber (Fig. 4, Taf. IX). Die Teilungen der Kerngrundsubstanz und ihrer Hautschicht habe ich nicht beobachtet; es scheint, daß dieser Vorgang sehr schnell verläuft; auch bietet die Kleinheit des Objekts und die während des Wachstums der Zelle stattfindenden lebhaften Plasmaströmungen bei der Beobachtung zu große Schwierigkeiten, als daß alle Details der Zellkernteilung wahrgenommen werden könnten. Man sieht jedoch kurz nach dem Erscheinen der tonnenförmigen Doppelkerne zwei Tochterkerne von gewöhnlicher kugelige Form in der Zelle liegen (Fig. 4, Taf. IX), die sich bald voneinander entfernen und an den entgegengesetzten Polen der Zelle zu liegen kommen.

Auch über die weiteren Vorgänge in den sich teilenden Zellen und über die Rolle, welche die Zellkerne bei der Bildung der Trennungswand spielen, kann ich lückenlose Beobachtungen nicht mitteilen. Soviel scheint mir sicher zu sein, daß in den meisten Fällen, wenigstens für die jüngsten Entwicklungsphasen vegetativer Stäbchen, die beiden Tochterkerne sich noch einmal teilen und von den vier so entstandenen Tochterkernen zwei an den Polen verbleiben, die zwei anderen aber gegen die Mitte der Zelle wandern und sich an der Anlage der Trennungswand beteiligen; wenigstens habe ich öfters kurz vor der Zellteilung vier Zellkerne in der soeben geschilderten Lagerung gesehen. In den meisten Fällen, namentlich aber in etwas älteren Kulturen, scheint sich die Zellteilung in anderer Weise zu vollziehen. Man sieht dann in den Zellen nur zwei individualisierte und an den Polen liegende Zellkerne, dafür aber gegen die Mitte der Zelle und der Zellmembran anliegend Chromidien ohne Grundsubstanz und Hautschicht, die öfters sogar



durch Chromatinfäden miteinander verbunden sind, sich demnach in gleicher Weise wie die individualisierten Zellkerne durch Teilungen vermehren dürfen. Ob diese Chromidien durch Zerfall des zweiten Paares der Tochterkerne entstehen, oder sich direkt aus dem Zellplasma herausdifferenzieren, muß ich dahingestellt sein lassen; jedenfalls wandern diese Chromidien gegen die Mitte der Zelle zu und legen sich hier in Vierzahl, paarweise gegenüber, der Zellwand an. Zwischen diesen Chromidien wird die neue Zellwand (Trennungswand) gebildet; die Art und Weise, wie letztere entsteht, läßt sich jedoch nicht feststellen. (Fig. 7 b Taf. IX).

Für die Annahme, daß die Chromidien aus dem Zerfall des zweiten Tochterkernpaares entstehen, scheint der Umstand zu sprechen, daß in späteren Entwicklungsstadien — selbst unter günstigen Lebens- und Ernährungsverhältnissen — individualisierte Zellkerne öfters ganz verschwinden und die Zellen nur Chromidien in größerer Anzahl führen. Solche vegetative Stäbchen färben sich in der Regel intensiver und gleichmäßig und stellen wohl Übergangsformen zu dem zweiten Typus der vegetativen Stäbchen, wo keine geformten Kernelemente im Zellinhalt vorkommen, letzterer sich gleichmäßig und intensiv färbt und die ganze, mit einer mehr oder weniger dicken Membran sich umhüllende Zelle in eine „diffuse Kernzelle“ verwandelt wird. Wie oben im Kapitel über Morphologie näher ausgeführt wurde, entstehen solche diffuse Kernzellen unter weniger günstigen Lebensbedingungen, bei Zusatz von wenig wirksamen Humaten, Eisenhydroxyd in Zuckerlösung, Holzkohle u. dgl. Sie werden je nach der Art und Menge dieser Zusätze in einem früheren oder späteren Entwicklungsstadium gebildet, können ihr ganzes Leben lang, auch im Zustande der fruktifikativen Kokkenformen und Sporen ihren Charakter als diffuse Kernzellen bewahren oder gehen beim Wechsel der Lebensbedingungen, namentlich wenn sie der unmittelbaren Einwirkung der Luft ausgesetzt werden, in alveoläre Kernzellen und von diesen in die Normalformen mit individualisierten Zellkernen über. Sie sind jedenfalls, wie dies schon im morphologischen Teil betont wurde, als Anpassungsformen an bestimmte mehr oder weniger ungünstige Lebensbedingungen anzusehen und dokumentieren diesen ihren Charakter auch dadurch, daß sie bei längerer Einwirkung derjenigen Faktoren, welche ihre Entstehung bedingen, leicht und massenhaft degenerieren, Involutionsformen bilden und schließlich zugrunde gehen.



Andere geformte und ungeformte Zellbestandteile. Außer Zellkernen, Chromidien und der diffus verteilten Chromatin-substanz kommen als andere Zellbestandteile des Azotobacter noch Vakuolen, Volutin, Glykogen, fettartige Substanzen und Zellmembranen in Betracht.

Vakuolen sind keine konstanten und regelmäßigen Erscheinungen des Zellinhalts, scheinen sogar nur unter Bedingungen aufzutreten, welche die normale Lebenstätigkeit der Zellen in irgend einer Weise schädlich beeinflussen. Bringt man einen Tropfen Nährlösung mit jungen und kräftigen Azotobacterzellen, die keine Spur von Vakuolen entdecken lassen, unter Deckglas und schließt dieses mit Vaseline ab, so sieht man schon nach einigen Stunden Vakuolen in größerer Anzahl in den Zellen auftreten. Ob kleinere Vakuolen, die zuweilen in normal verlaufenden Kulturen im Zellinhalte erscheinen, als normale Bildungen zu betrachten sind, ist schwer zu beantworten. Jedenfalls sind größere oder in größerer Anzahl auftretende Vakuolen als sichere Anzeichen der gestörten Lebensfunktion, bezw. der beginnenden Degeneration anzusehen. Gegen Farbstoffe verhalten sie sich indifferent und nehmen dieselben nicht auf; irgend welche geformte Einschlüsse, wie metachromatische Körnchen und Glykogentröpfchen, die in Vakuolen von Hefezellen von Guilliermond (32), Kohl (30) u. a. beobachtet wurden, werden in den Vakuolen der Azotobacterzellen nicht angetroffen. Dagegen werden sehr große Vakuolen, welche in den blasig erweiterten und hefeartig sprossenden Involutionsformen des Azotobacter fast das ganze Lumen der Zelle ausfüllen, mit Anilin-farbstoffen schwach gefärbt.

Volutin. Nach H. Fischer (2, S. 139) sollen die in älteren Zellen des *Az. chroococcum* auftretenden Körnchen aus Volutin bestehen, da sie mit Methylenblau und 1%-iger Schwefelsäure behandelt, die Volutinreaktion geben. Zweifellos meint Fischer, wie es sich aus den weiter angegebenen Reaktionen dieser Körnchen ergibt, die in sporulierenden Kokkuszellen auftretenden Zellkerne und Chromidien. Daß diese Zellelemente einmal aufgenommene Farbstoffe auch festhalten und nicht leicht abgeben, wurde schon oben betont und hat gewiß mit den sogen. Volutinreaktionen nichts gemein. Überhaupt scheint mir das von Arthur Meyer (33) in die Bakteriologie eingeführte und als Reservestoff bezeichnete Volutin von sehr hypothetischer Natur zu sein; in vielen Fällen wird es sich wohl als



unter bestimmten Bedingungen stofflich metamorphosierte Plasma- oder Kernsubstanz erweisen. In Azotobacterzellen kommt Volutin als Reservestoff gar nicht vor.

Glykogen. Die jungen vegetativen Stäbchenformen färben sich mit Jodjodkaliumlösung schwach gelblich; dagegen nehmen die fruktifikativen Kokkenformen in allen Entwicklungsphasen eine tief rotbraune Farbe an, welche beim Erwärmen des Präparats verschwindet, um nach dem Erkalten wiederzukehren. Auch in reifen Sporen ist Glykogen stets in reichlicher Menge vorhanden, wovon man sich sowohl mittels der Jodreaktion als auch durch Hydrolyse mit 1%-iger Salzsäure überzeugen kann. Werden alte Kulturen, in denen sich Sporen reichlich gebildet haben und in denen die verabreichte Glukose bis auf letzte Spuren verbraucht wurde, mit 1%-iger Salzsäure unter schwachem Erwärmen längere Zeit digeriert und dann mit Fehling'scher Lösung behandelt, so entsteht ein reichlicher Niederschlag von Kupferoxydul; setzt man zu den so behandelten Sporen Jodjodkalium hinzu, so entsteht je nach der Dauer der Hydrolyse entweder gar keine oder nur schwache rotbraune Färbung. Da Glykogen normal nur im Fruktifikationsstadium in den Zellen gespeichert wird, so fällt ihm zweifellos die Rolle eines Reservestoffs zu: es wird in den sporulierenden Zellen angesammelt, um bei der Sporenkeimung verbraucht zu werden. Tatsächlich enthalten junge Keimlinge kein Glykogen mehr. Mit der Stickstoffbindung des Azotobacter hat das Glykogen, welches nach Heinze (27) bei diesem Prozeß vielleicht die wichtigste Rolle spielen soll, gewiß nichts zu tun; denn Sporen und andere Ruhezustände kommen bei diesem Prozeß gar nicht in Frage und sporulierende Kokken, in welchen Glykogenaufspeicherung stattfindet, können sich an der Assimilation des freien Stickstoffs nicht in erheblichem Maße beteiligen. Zwar wird Glykogen zuweilen auch in vegetativen Stäbchen in größeren Mengen beobachtet, namentlich wenn diese zu sogenannten Riesenstäbchen auswachsen, aber dann sind es absterbende Stäbchen mit allen solche Formen charakterisierenden Involutionerscheinungen. Ebenso sind die von Heinze zuerst beobachteten, mehr oder weniger verschleimten Diplokokken von unregelmäßig eckiger Gestalt, die mit Glykogen vollgestopft sind, nichts Anderes, als ziemlich weit fortgeschrittene Involutionsformen.

Das Glykogen tritt in den Azotobacterzellen in Form von kleineren und größeren, ziemlich stark lichtbrechenden Tröpfchen auf



und bedingt dadurch, namentlich wenn es massenhaft auftritt, wie dies bei den sporulierenden Kokken und den unreifen Sporen gewöhnlich der Fall ist, das körnige Aussehen und den starken Lichtglanz dieser Zellen, läßt auch ihre wabige Struktur deutlicher hervortreten. Bei der Keimung wird es aufgelöst und mit dem Plasma vermenget, wodurch die Sporen, namentlich vor Ausbildung der Zellkerne, bzw. Chromidien ihren Lichtglanz verlieren.

Fette und fettartige Substanzen. Im normalen Entwicklungsgange kommen Fette und ähnliche Stoffe in den Azotobacterzellen nicht vor; dagegen scheinen sie in absterbenden und degenerierenden Zellen sehr verbreitet zu sein. Schon Beijerinck (1) brachte in seiner ersten Publikation ein Photogramm mit solchen degenerativen Zellen, von denen er sagt, daß sie mit Fetttropfchen angefüllt sind, gibt aber nicht an, mit welchen Reagenzien er diese ihre Natur festgestellt hat, weshalb es unentschieden bleiben muß, ob die von mir in degenerierenden Zellen gefundenen „fettartigen Substanzen“ mit den Fetttropfchen Beijerinck's identisch sind. Ich werde auf diese „fettige Degeneration“ bestimmter Inhaltsbestandteile der Zellen noch weiter unten zu sprechen kommen.

Zellmembranen. In den jugendlichen Azotobacterzellen erscheint die Membran als eine fein gezeichnete Linie, welche die Zelle nach außen abgrenzt. Sie zeigt Anilinfarben und Reagenzien gegenüber das gleiche Verhalten wie das von ihr begrenzte Cytoplasma, und scheint nichts Anderes, als die äußere verdichtete Plasmaschicht, das Ektoplasma, zu sein. Sie besteht jedoch, wie man dies zuweilen an gefärbten Präparaten (s. Fig. 2 a, Taf. VIII) und sehr oft an sich spaltenden Zellen (s. Fig. 4, Taf. VII) beobachten kann, aus zwei gut differenzierten Schichten: einer inneren kompakten, welche dem Protoplasten unmittelbar anliegt, und einer äußeren, gallertartigen, welche als äußere Schleimhülle die ganze Zelle umgibt. Diese äußere Schleimhülle scheint nie zu fehlen und kann in allen Lebensstadien beobachtet werden; sie kann schon im jugendlichen Stadium eine gewisse Mächtigkeit erlangen und bedingt dann, wie ich glaube, die Undurchsichtigkeit und das weiß bis gelblich mattglänzende Aussehen der Zellen.

Unter Umständen kann die Membran diese ihre Beschaffenheit in allen Phasen der vegetativen und der fruktifikativen Evolution des Azotobacter behalten; dann aber verliert derselbe die Fähigkeit, Sporen zu bilden und das braune Pigment in denselben anzuhäufen.



Solche „asporogene Formen“ des *A. chroococcum* stellen sich zuweilen als spontane Variationen von selbst ein; sie wurden auch, wie oben erwähnt, von älteren Forschern (Beijerinck, Löhnis und Westermann) beobachtet. Man kann durch gewisse Kulturmaßregeln ihr Erscheinen und durch andere ihr Umschlagen in die gewöhnliche sporenbildende Form beschleunigen, trotzdem aber ist es mir bis jetzt nicht in einwandfreier Weise gelungen, dieselben künstlich zu erzeugen; es kann jedoch keinem Zweifel unterliegen, daß diese spontane Variation durch äußere Lebensfaktoren beeinflußt, resp. bedingt wird, denn unter Bedingungen, welche die vegetative Propagation begünstigen, werden auch bei der sporogenen Varietät Sporen nur in beschränktem Maße gebildet. Daraus läßt sich schließen, daß zur Ausbildung der Asporogenese außer den äußeren Ursachen noch eine innere, in der Organisation des Protoplasten liegende Disposition vorhanden sein muß.

Unter Bedingungen, welche der vegetativen Vermehrung weniger günstig oder gar ungünstig sind, wird, wie schon oben ausgeführt wurde, im vegetativen Lebensstadium und zur Zeit der Sporulation eine verhältnismäßig dicke, doppelt konturierte und konsistente Membran nach außen ausgeschieden. Dieselbe ist gewiß von anderer chemischen Konstitution, wie die ursprüngliche Ektoplasamembran, denn sie wird durch Anilinfarben nicht gefärbt; doch kann ich über ihre chemische Zusammensetzung nichts Näheres angeben. Sie ist ebenso, wie die ektoplasmatische Membran von einer zarten Gallerthülle nach außen umgeben und scheint auch in bezug auf ihre Organisation von derselben nicht sehr verschieden zu sein, da sie Cilien nach außen durchdringen läßt. Sie ist schließlich ebenso wie die Ektoplasamembran verquellungsfähig und löst sich oft nach Absterben der Zelle in Schleim auf.

Eine andere Beschaffenheit nimmt die Zellmembran mit der beginnenden Verquellung an, welche normal mit dem Eintritt des Fruktifikationsstadiums einsetzt. Sobald die Membranen der zu Kokken umgeformten Mutterzellen zu verquellen beginnen, nimmt die verquellende Membran Anilinfarbstoffe schnell und gierig auf und färbt sich je nach dem Grad der Verquellung mehr oder weniger intensiv. Diese Beschaffenheit behält die äußere Membran auch weiterhin während der Sporenbildung und im Sporenzustande, sie wird stets mehr oder weniger stark, im Sporenstadium sogar sehr intensiv und momentan gefärbt. Wird sie nicht total verquellt und



aufgelöst, wie dies beim normalen Entwicklungsgange Regel ist, sondern in Gallerthüllen umgewandelt, dann behält wenigstens die innere, den Kokkus unmittelbar umgebende und die äußere, peripherische Schicht der Gallerthülle ihre Affinität für Anilinfarbstoffe; doch werden die dazwischen liegenden Schichten mehr oder weniger, zuweilen sogar sehr intensiv und in ihrer ganzen Ausdehnung gefärbt. Worauf dieses verschiedene Verhalten beruht und welche stofflichen Metamorphosen der Membransubstanz dabei in Frage kommen, entzieht sich vorläufig der Beurteilung. Zu erwähnen wäre noch, daß in den Gallerthüllen öfters konzentrische Schichten, die auf die verschiedene Färbbarkeit derselben zurückzuführen sind, und radiär verlaufende Streifen beobachtet werden können. Auch ist es eine allgemeine Erscheinung, daß in allen den Fällen, wo mächtige Gallerthüllen entwickelt werden, wie dies in mit Ferrohydroxyd versetzten Nährmedien stets der Fall ist, die innerste Schicht um den Kokkus herum eine Anzahl von intensiv gefärbten chromatischen Körnchen von verschiedener Größe aufweist. Diese Erscheinung läßt darauf schließen, daß die chromatischen Zellelemente mit der Ausbildung der Gallerthüllen im kausalen Zusammenhang stehen, und bestätigt indirekt die schon oben mitgeteilte Beobachtung, daß Zellkerne oder wenigstens die aus ihnen abzuleitenden Chromidien sich an der Bildung der Trennungswände beteiligen. Bemerkenswert ist auch der Umstand, daß die Gallerthüllen in der Regel den Kokkus nicht unmittelbar umschließen, sondern durch eine hyaline, nicht färbbare Schicht von demselben getrennt sind (Fig. 9 c, Taf. VII), doch hängt dies mit dem Entwicklungsstadium zusammen und in allerjüngsten Stadien der Gallerthüllenbildung liegt die chromatische Innenschicht der Gallerthülle unmittelbar der Kokkusmembran an.

Hier wäre auch der Ort, die Art und Weise, wie die Sporenmembran angelegt und differenziert wird, näher ins Auge zu fassen. Diese Frage ist insoweit von Wichtigkeit, als damit über den morphologischen Charakter der Azotobactersporen und über die Stellung dieses Organismus im System zum Teil entschieden wird. Da jedoch diese Frage auch mit anderen wichtigen Problemen allgemeiner Natur innig verknüpft ist, so soll dieser Punkt in einem besonderen Abschnitt zur Sprache gelangen.

Sporenbildung und Sporen. Bekanntlich hat de Bary (34) bei den Bakterien zweierlei Arten von Sporen unterschieden,



die er als Endosporen (endogene Sporen) und Arthrosporen bezeichnete. Erstere werden im Innern der Mutterzellen durch Verdichtung und Kontraktion des Zellplasmas, welches sich gleichzeitig mit einer besonderen Membran (Sporenmembran) umgibt, gebildet und werden durch Auflösung der Mutterzellmembran frei; letztere entstehen unmittelbar aus Gliedern vegetativer Zellen oder Zellverbände, wobei diese sich vergrößern und mit derberen Membranen umhüllen oder aber direkt ohne irgend welche Umwandlung zum Anfangsglied neuer vegetativer Generationen werden können. Diese von de Bary eingeführte Einteilung der Bakterien sporen wurde trotz ihrer Mängel, auf die besonders Migula in seinem System der Bakterien aufmerksam machte, von den meisten Forschern akzeptiert und für die Systematik der Bakterien verwertet; doch konnte, soviel ich weiß, die Existenz von Arthrosporen als besonderer Fortpflanzungsorgane, die demnach von denen der vegetativen Zellen auch morphologisch und entwicklungsgeschichtlich verschieden sein müßten, nicht nachgewiesen werden.

Gehen wir nach diesen einleitenden Bemerkungen zu den Sporen des *Az. chroococcum* und der Art und Weise ihrer Entstehung über. Fassen wir den Begriff der Sporen nicht in dem von de Bary bei der Definition von Arthrosporen gebrauchten Sinne, sondern als ein entwicklungsgeschichtlich und morphologisch von den vegetativen Lebensformen unterschiedenes, besonderes Fortpflanzungsorgan auf, so herrscht beim *Azotobacter* in bezug auf Sporenbildung die gleiche Mannigfaltigkeit, wie in allen übrigen Details der morphologischen Entwicklung. Wir haben gesehen, daß *Azotobacter* außer den eigentlichen Dauersporen (Sporen *sensu strictiore*) auch Sporen im weiteren Sinne des Wortes, so zu sagen vegetative Sporen bildet, welche vor ihrer Auskeimung sich durch Teilungen vegetativ vermehren. Es sind dies die in Gallertkolonien wachsenden und mit besonderen Schleimhüllen umgebenen Kokken, welche nach Auflösung der äußeren Schleimhülle und Durchbrechung der inneren, derberen Membran genau in derselben Weise auskeimen und sich in vegetative Stäbchenformen umwandeln wie die Keimlinge der echten oder Dauersporen. Es kann auch wohl als sicher angenommen werden und ich zweifle keinen Augenblick daran, obgleich ich aus Mangel an Zeit den Vorgang nicht verfolgt habe, daß auch die freien, d. h. nicht in Gallerthüllen eingebetteten Kokken, wenn sie in frische Nährlösungen gebracht



werden, sich ebenso wie die beiden zuerst genannten Formen zu den vegetativen Stäbchen weiter entwickeln. Dies muß auch für diejenigen asporogenen Modifikationen oder Varietäten des *Az. chroococcum* angenommen werden, welche keine Gallertkolonien und keine Dauersporen bilden, vielmehr im vegetativen Lebensstadium nur in Form von gewöhnlichen, normalen Stäbchen und im fruktifikativen als dünnwandige „alveoläre Kernzellen“ ohne Schleimhüllen und Sporenmembranen vorkommen und auf festem Nährboden weiße, sich nicht braun verfärbende Kolonien bilden. In allen diesen Fällen sind jedoch die als „Sporen“ aufzufassenden Fortpflanzungsorgane morphologisch durch ihre Kokkusform und cytologisch durch die alveoläre Struktur des Cytoplasmas und des Zellkerns von den vegetativen Formen scharf unterschieden.

Nicht minder mannigfaltig sind auch die als Dauersporen zu bezeichnenden Fortpflanzungsorgane sowohl in bezug auf die Art ihrer Entstehung, als auch bezüglich ihrer Strukturen. Wie schon oben dargetan wurde, können Dauersporen des *Azotobacter* direkt aus den vegetativen Formen des zweiten Typus, d. h. aus den dickwandigen „diffusen Kernzellen“ hervorgehen; es wird nur die schon vorhandene derbe Membran weiter verdickt und außerhalb derselben eine zweite, als Exosporium zu bezeichnende Membran gebildet, in welchem Falle eine Dauerspore direkt aus der vegetativen diffusen Kernzelle entsteht. Diese Art von Sporen kommt verhältnismäßig selten vor und scheint nur auf diejenigen Fälle beschränkt zu sein, wo nach einer längeren Dauer einer verhältnismäßig schwachen Aeration rasches Eintrocknen der Substanz eintritt. Regel ist es vielmehr, daß die diffusen Kernzellen des vegetativen Stadiums sich mit Gallerthüllen umgeben und in den Gallertkolonien in diffuse oder alveoläre Kernkokken übergehen. Findet die Weiterentwicklung der Kokken bei ungehindertem Luftzutritt statt, so werden die Gallerthüllen aufgelöst, die in denselben eingeschlossenen Kokken umhüllen sich mit einer neuen Membran, die sich weiter zur Sporenmembran differenziert, und werden so zu Dauersporen. Es kann aber auch der Fall eintreten, daß es beim raschen Austrocknen des Substrats zur Auflösung der Gallerthüllen gar nicht kommt, letztere vielmehr einschrumpfen, vertrocknen und so zur Sporenmembran werden. In diesem Falle geht auch der diffuse Kernkokkus nicht in den alveolären Zustand über und es entsteht sofort eine Dauerspore mit diffusem Kernplasma.



Schon aus dieser Darstellung läßt sich entnehmen, daß die Art und Weise, wie die Sporenmembran entsteht, recht mannigfaltig ist. Die Frage demnach, ob die Sporen des *Az. chroococcum* endogen im Innern der Mutterzelle oder direkt aus der Mutterzelle durch Umhüllung derselben mit einer besonderen Membran, d. h. exogen, entstehen, kann für beide Fälle bejaht werden. Sie entstehen endogen, wenn in der sich amorph auflösenden oder zu Gallerthüllen aufquellenden Mutterzellmembran eine besondere, als Sporenmembran zu bezeichnende Membran um den fruktifikativen Kokkus angelegt wird; sie entstehen exogen, wenn die verquellende Mutterzellmembran beim raschen Eintrocknen sich unmittelbar dem Kokkus anlegt und so zur Sporenmembran wird. Ob es im letzteren Falle doch nicht zur Anlage einer zarten, unter gewöhnlichen Umständen nicht sichtbaren, besonderen Sporenmembran kommt, muß ich dahingestellt sein lassen. Der einzige Unterschied zwischen den anderen endosporenen Bakterien und den Azotobactersporen würde darin liegen, daß bei den ersteren die Mutterzellmembran in der Regel erst nach Fertigbildung der Sporen verquillt, während bei Azotobacter sich dieser Vorgang gleichzeitig mit, zuweilen sogar vor der Ausbildung des Fruktifikationsorgans vollzieht. Übrigens spielt sich auch bei den endosporenen Bazillen der Auflösungsprozeß der Sporenmutterzellmembranen nach meinen Erfahrungen bald gleichzeitig mit der Sporenbildung, bald wieder recht spät ab.

Viel wichtiger als die Art und Weise der Anlage der Sporenmembran sind für die Frage, ob Azotobactersporen den endogenen Sporen anderer Bakterien an die Seite gestellt werden können, die inneren Vorgänge und die Strukturveränderungen, welche in den Bakterienzellen während der Sporulation vor sich gehen. Leider wissen wir über diese Vorgänge gar nichts oder nur äußerst wenig. Soviel mir bekannt ist, hat nur Schaudinn (35) beim *Bacillus Bütschlii* den Akt der Sporenbildung in cytologischer Beziehung verfolgt und, soweit ich beurteilen kann, auch klargelegt. Bei dieser Bakterie ist die Kernsubstanz im vegetativen Lebensstadium diffus oder, richtiger gesagt, alveolär durch das ganze Plasma verteilt. Tritt nun der *Bacillus* in das Fruktifikationsstadium ein, so fließt die Kernsubstanz an den beiden Polen (bei *B. Bütschlii* werden zwei im Stäbchen angelegt) zu länglichen, alveolären Gebilden zusammen, welche „den Zellkernen vieler Protozoen außerordentlich ähnlich sind“ und junge Sporenanlagen darstellen. Indem diese



Sporenanlagen durch Ausstoßung des Organisationswassers ihre alveoläre Struktur verlieren, gleichzeitig sich verdichten und stark lichtbrechend werden, werden sie von einer Plasmaschicht bedeckt, umhüllen sich mit einer doppelten Membran und werden so zu Sporen. Beim *Azotobacter* verläuft der Sporenbildungsprozeß in ähnlicher Weise, aber in gerade umgekehrter Reihenfolge. Im vegetativen Zustande ist die Kernsubstanz normal nicht diffus oder alveolär mit dem Plasma vermenget, sondern zu individualisierten Zellkernen organisiert; beim Eintritt in das Fruktifikationsstadium lösen sich die Zellkerne in Chromidien auf, welche sich mit dem Cytoplasma vermengen und eine alveoläre Zellstruktur veranlassen; diese geht aber mit fortschreitender Reife verloren und die Spore wird zu einer „diffusen Kernzelle“. Ist aber die Kernsubstanz, wie dies bei den als Anpassungsform bezeichneten diffusen Kernzellen der Fall ist, im vegetativen Stadium diffus im Plasma verteilt, so kann die Spore direkt aus der diffusen Kernzelle werden, oder es geht bei der Fruktifikation die diffuse Kernsubstanz in den alveolären Zustand über, um dann wieder zur diffusen Kernzelle zurückzukehren. Erst dann wird eine Plasmaschicht um die alveoläre Kernzelle und hierauf auch die doppelte Sporenmembran angelegt. In allen diesen Fällen resultiert demnach, insoweit es sich um normale und nicht abortive oder krankhafte Zustände handelt, eine Spore mit diffus verteilter Kernsubstanz. Die cytologischen Vorgänge sind bei *Azotobacter chroococcum* und *Bacillus Büttschlii*, streng genommen, die gleichen, spielen sich aber in entgegengesetzter Reihenfolge ab. Soviel ich die in der Literatur zerstreuten, sehr fragmentarischen Angaben über die cytologischen Vorgänge bei der Sporenbildung anderer Bakterien beurteilen kann und soweit meine eigenen, an anderen Bakterien gemachten Beobachtungen reichen, ist die Sporenbildung bei den Bakterien stets mit Strukturveränderungen der Kernsubstanz bzw. der chromatischen Bestandteile der Zelle verbunden. Ich hoffe, auf diesen Gegenstand bei einer anderen Gelegenheit in nicht allzuferner Zeit zurückkommen zu können.

Cytologische Regenerations- und Degenerationserscheinungen. Es erübrigt noch, die Erscheinungen der Regeneration und der Involution, die wir schon in der morphologischen Entwicklung des *Azotobacter* kennen gelernt haben, vom cytologischen Gesichtspunkte aus näher zu beleuchten.

Bei der Regeneration des *Azotobacter*, gleichviel ob sich dieselbe



durch Ausstoßen bestimmter Elemente der Leibessubstanz außerhalb der Zelle oder im Innern derselben vollzieht, spielen die Zellkerne, resp. die als Chromidien bezeichneten Zellkernbestandteile die Hauptrolle. Wenn sie auch nicht als die alleinigen Träger des Lebens angesprochen werden können und an der Verjüngung auch das Plasma beteiligt sein muß, so überwiegt doch der Anteil der Kernsubstanz an diesem Prozeß bei weitem die Mitwirkung der plasmatischen Zellsubstanz. Dies kann schon daraus geschlossen werden, daß die aus der Zelle ausgestoßenen Körperchen sehr stark lichtbrechend sind, demnach in der Hauptmasse aus chromatischer Kernsubstanz bestehen müssen. Zieht man noch in Erwägung, daß Zellkerne und deren Abkömmlinge, die Chromidien, wie dies an mehreren Stellen dieser Arbeit dargetan wurde, an den wichtigsten Lebensprozessen der Zelle, wie Vermehrung, Teilung, Fruktifikation nicht nur regen Anteil nehmen, sondern diese Prozesse gewissermaßen erst einleiten und hervorrufen, so wird man sich der Einsicht nicht verschließen können, daß sie eben und nicht das Plasma das treibende Agens der Zellverjüngung sind. Die Anschauung, daß die Verjüngung der Zellen von den Zellkernen und deren Abkömmlingen ausgeht, findet übrigens ihre Stütze in den zahlreichen Beobachtungen, die ich gelegentlich anderer Untersuchungen über Regenerationserscheinungen gemacht habe. Es wurde schon oben erwähnt, daß ich die Teilungen der aus absterbenden Zellen ausgestoßenen lichtbrechenden Körperchen (Fig. 9, Taf. IX) direkt beobachtet habe; sie behielten dabei ihren starken Lichtglanz, welcher erst dann verloren ging, nachdem sie zur bedeutenderen Größe ausgewachsen waren und Strukturen der gewöhnlichen Zellen erkennen ließen. In manchen Tropfen- und Großkulturen waren sie massenhaft zu finden und zeigten alsdann die gleichen Reaktionen, wie die in den gewöhnlichen Zellen vorkommenden Zellkerne und Chromidien. Ich konnte auch zu wiederholten Malen die Entstehung der Regenerationsformen aus den Zellkernen im Innern der Zellen beobachten. In einer Tropfenkultur, welche nach 2 Tagen mit Vaselineverschluß gegen Verdunstung geschützt wurde, zeigten die meisten Stäbchen schon am nächsten Tage Absterbeerscheinungen und gingen bald zugrunde; ein Teil der Stäbchen entwickelte sich aber weiter zu Kokken mit vier lichtglänzenden Chromidienkörperchen. In diesen Kokken, von denen einige sogar schwärmfähig waren und ziemlich lebhaft Eigenbewegungen zeigten, konnte ich



nach etwa 10 Tagen größere lichtbrechende Körperchen beobachten, die bei stärkeren Vergrößerungen sich als winzige fruktifikative Kokken mit 4 peripherisch angeordneten, stärker lichtbrechenden Körnchen erwiesen. Es unterliegt demnach keinem Zweifel, daß hier eine Umwandlung der Chromidien direkt in sporulierende Kokkenzellen stattgefunden hat. Bemerkenswert ist noch der Umstand, daß die betreffenden Mutterkokken zu dieser Zeit noch schwärmfähig waren und Eigenbewegungen zeigten, was von der außerordentlichen Lebensenergie unseres Mikroben bereitetes Zeugnis gibt. Ähnliches habe ich in mit Vaseline gedichteten Tropfenkulturen, zu denen Gallertkolonien von sporulierenden Kokken zur Aussaat verwendet wurden, kurz nach Auskeimung derselben beobachten können; es kam in diesem Falle bei der Mehrzahl der gekeimten Individuen nicht zur Ausbildung der vegetativen Stäbchenformen, sondern es bildeten sich schon in der dritten Generation wieder Kokkenformen, in denen regenerativ aus den Chromidien winzige Alveolarkernzellen entstanden. Solche Kokken mit regenerativ entstandenen winzigen Kokken im Innern kann man auch in alten Kulturen solcher Nährlösungen, die wie z. B. die Beijerinck'sche Mannit- oder Glukosenährlösung für die normale Entwicklung des *Azotobacter* ungeeignet sind, sehr oft beobachten. Ich verweise diesbezüglich auf Fig. 8, Taf. IX, und deren Erklärung. Zu erwähnen wäre noch, daß regenerative Mikroazotobacterkokken auch in den Gallertkolonien neben den Normalformen nicht gerade selten beobachtet werden können.

Wie die Regenerationsvorgänge stehen auch die Degenerationserscheinungen in den absterbenden Zellen mit der Kernsubstanz der Zelle im innigen Zusammenhange. Die ersten Anzeichen der gestörten Funktion des Zelllebens geben sich vor allem in den Veränderungen kund, welche die Kernelemente der Zelle erleiden. Äußerlich sieht die krankelnde Zelle bezüglich ihrer Form, Größe und Beschaffenheit des Cytoplasmas noch ganz normal aus, sie verrät jedoch ihren krankhaften Zustand durch Vermehrung der Zellkernelemente oder durch Veränderung der Zellkernstruktur. Im vegetativen Lebensstadium manifestieren sich diese Veränderungen entweder dadurch, daß individualisierte Zellkerne mit dem hellen Hof verschwinden, dafür aber Chromidien in größerer Anzahl (8—10—12 und mehr) in den Zellen zum Vorschein kommen, oder aber dadurch, daß individualisierte Zellkerne zwar mehr oder



weniger intakt erhalten bleiben, sich aber stark vergrößern und mit Fuchsin-Methylgrün nicht die tief- bis schwarzblaue Färbung geben, sondern eine rotviolette Farbe annehmen (s. Fig. 5, *xy*, Taf. VII, und deren Erklärung). Ich glaube, daß die soeben geschilderten Veränderungen, welche unter minder günstigen Ernährungsbedingungen schon in ganz jungen Kulturen beobachtet werden, die Vorstadien der als Anpassungsformen gedeuteten vegetativen Zustände der diffusen Kernzellen bilden. Vorausgesetzt muß dabei werden, daß die Aerationen- und sonstigen Ernährungsverhältnisse nicht dermaßen ungünstig sind, daß sie die Entwicklung hemmen oder abnorme Degenerationsformen hervorbringen. Ist das letztere der Fall, so werden eben keine Anpassungsformen gebildet, vielmehr treten Involutionsformen mit allen Erscheinungen der fortschreitenden Degeneration der Zellen zum Vorschein. Diese Erscheinungen beruhen darauf, daß Zellkerne und Chromidien in immer kleinere Partikelchen zerfallen und den ganzen Inhalt der zugleich auch äußerlich sich deformierenden Zelle mehr oder weniger dicht erfüllen. Diese Kernpartikelchen färben sich anfänglich, solange sie noch klein sind, mit Kernfarbstofflösungen in der für Chromatinsubstanz charakteristischen Weise, später nehmen sie an Größe und Umfang zu, werden in eigentümliche, weiß oder gelblich glänzende Körnchen von bald rundlicher, bald länglicher, öfters biskuitähnlicher Form umgestaltet und verlieren gänzlich ihre Fähigkeit, sich mit Kernfarbstoffen und überhaupt mit Anilinfarbstoffen zu färben. Die geschilderten Veränderungen gehen sowohl in vegetativen, als auch in fruktifikativen Zellen ohne Rücksicht auf deformative Gestaltungen, welche die Zellen gleichzeitig erleiden, in gleicher Weise vor sich. Gleichzeitig mit diesen stofflichen Umänderungen der Kernelemente wird in den absterbenden Zellen, gleichviel ob dieselben vegetativ oder fruktifikativ sind, Glykogen in reichlichen Mengen gespeichert, selbstverständlich nur in dem Falle, wenn Kohlenstoffnahrung im Nährsubstrat noch nicht aufgebraucht wurde; denn sie färben sich schon mit ganz schwacher Jodjodkaliumlösung tief rotbraun. In diesem Zustande können sich solche Involutionsformen wochen- und monatelang erhalten. Allmählich aber schwindet auch das Glykogen zuerst aus einzelnen, dann auch aus der Mehrzahl der Zellen, oder auch aus allen, welche alsdann mit einer zumeist gelblich glänzenden, homogenen Masse oder mit Körnchen von derselben Beschaffenheit erfüllt erscheinen (Fig. 5—7,



Taf. VIII). Sind es sporulierende Kokken gewesen, die dieser Degeneration anheimfallen, so füllt die gelbliche, homogene Masse den ganzen Innenraum der Spore aus. Sind es dagegen vegetative Formen gewesen, die involutiv zu kürzeren oder längeren Fäden ausgewachsen sind, so bilden sich in ihnen einzelne gelbliche Körnchen, welche namentlich in gleichmäßig dünnen Fäden zu längeren Reihen von glänzenden, rundlichen Gebilden angeordnet sind und so Reihen von endogen gebildeten Sporen vortäuschen können. Tatsächlich hat Mencl (11) solche zu längeren Fäden ausgewachsene und mit lichtbrechenden Körnchen erfüllte Degenerationsformen beobachtet, die fraglichen Körnchen für Sporen gehalten und als solche abgebildet. Hierher gehören auch die von Heinze (27) beobachteten unregelmäßig eckigen oder auch regelmäßig kugelförmigen Riesenzellen, welche von dem genannten Forscher für Sporangien gehalten und erklärt wurden. Hätten die beiden Forscher mit den vermeintlichen Sporen Keimungsversuche angestellt, so hätten sie sich leicht überzeugen können, daß diese Gebilde nicht weiter entwicklungsfähig sind.

Die stofflichen Veränderungen, welche die Kernelemente und wohl auch das Plasma der degenerierenden Zellen erleiden, sind sehr weitgehend. Die fraglichen glänzenden Körnchen und Massen, welche aus den Kernelementen und dem Plasma bei der Zelldegeneration entstehen, zeigen sich nicht nur Farbstoffen, sondern auch anderen Reagenzien gegenüber sehr indifferent. Sie werden weder von Kalilauge, noch von verdünnter Salz- und Schwefelsäure aufgelöst oder in bemerkbarer Weise angegriffen; auch in Alkohol und Äther sind sie unlöslich oder quellen nur, namentlich in den Anfangsstadien ihrer Entstehung etwas auf. Dagegen werden sie schnell und leicht in xylolhaltigem Alkohol, reinem Xylol und Chloroform aufgelöst. Werden Haufen von degenerierten Sporen mit diesen Lösungsmitteln behandelt, so löst sich zumeist der ganze Inhalt der Sporen ganz auf und es bleibt nur ein Netz von entleerten Membranen zurück. Mit Sudan III färben sich die Körnchen und homogenen Massen mehr oder weniger intensiv rot. Aus allen diesen Reaktionen ist zu schließen, daß die fraglichen degenerativen Gebilde des Zellinhalts aus einer fettartigen Substanz bestehen. Über die chemische Konstitution dieser Fettsubstanz kann ich nichts Näheres angeben und ich muß es Fachchemikern überlassen, ihre chemische Zusammensetzung zu bestimmen.



Es wäre hier vielleicht der Ort, die zahlreichen Analogien und Homologien, welche in morphologischer und cytologischer Beziehung zwischen *Azotobacter chroococcum* und manchen einzelligen Algen einerseits, manchen niederen Protozoen andererseits, bestehen, einer vergleichenden Betrachtung zu unterziehen. Doch würde ein solches Unternehmen weit über das Ziel hinausgehen, welches dieser Arbeit vorgesteckt wurde. Übrigens muß ich ein Eingehen auf dieses Thema schon aus dem Grunde unterlassen, da manche morphologische und cytologische Lebenserscheinungen unseres Organismus im vorigen nur andeutungsweise skizziert oder auch ganz mit Stillschweigen übergangen wurden, um das schon an sich recht komplizierte Bild der Entwicklungsgeschichte unseres Organismus noch nicht weiter zu komplizieren und zu verwirren. Auf manche dieser Erscheinungen werde ich im zweiten Teil dieser Abhandlung, insoweit dieselben mit biologischen und ernährungs-physiologischen Prozessen in Verbindung stehen, noch zurückkommen. Die allgemeinen Gesichtspunkte und Schlußfolgerungen, die aus meinen sowohl morphologisch-cytologischen, als auch biologisch-physiologischen Untersuchungen zu ziehen wären, werden zweckgemäß erst am Schluß dieser Arbeit zur Sprache gelangen.

### Literatur.

- 1) Beijerinck M. W. Über oligonitrophile Bakterien. Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenk. usw., Abt. II, Bd. VII, 1901.
- 2) Fischer Hugo. Über Stickstoffbakterien. Verhandl. d. naturh. Vereins d. Rheinl., Westf. usw., Jahrg. 62, 1905. Mit 1 Taf.
- 3) Fischer Hugo. Ein Beitrag zur Kenntnis der Lebensbedingungen von stickstoffsammelnden Bakterien. Zentrbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. XIV, 1905 und Zweiter Beitrag zur Kenntnis usw., daselbst Bd. XV, 1906.
- 4) Krzemieniewski Severin u. Helene. Zur Biologie der stickstoffbindenden Bakterien. Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Juillet 1906.
- 5) Christensen Harald R. Über das Vorkommen und die Verbreitung des *Azotobacter chroococcum* in verschiedenen Böden. Zentrbl. für Bakter. usw., Abt. II, Bd. XVII, 1907.
- 6) Schneider Ph. Mitteil. aus dem agricult.-chem. Institut., Zentrbl. für Bakter. usw., Abt. II, Bd. XVIII, 1907.
- 7) von Feilitzen. Untersuchungen über das Vorkommen von *Azotobacter* in Moorböden. Frühling's Landw. Ztg. 1910.
- 8) Benecke und Keutner. Über stickstoffbindende Bakterien aus der Ostsee. Berichte d. deutsch. botan. Gesellsch. Bd. XXI, 1903.



- 9) Lipman I. G. Azotobacter-Studien II. Ref. im Zentrbl. für Bakter., Abt. II, Bd. XIX, 1907 aus: XXVI Ann. report of the New-Jersey State Agricult. experim. Station, New Brunswick.
- 10) Löhnis F. und Westermann T. Über stickstoffbindende Bakterien. Zentrbl. f. Bakter., Abt. II, Bd. XVII, 1907.
- 11) Mencl Em. Die Kernäquivalente und Kerne bei *Azotobacter chroococcum* und seine Sporenbildung. Archiv für Protistenkunde, Bd. XXII, 1911.
- 12) Beijerinck M. W. und A. van Delden, Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. Zentrbl. für Bakter., Abt. II, Bd. IX, 1902.
- 13) Gerlach und Vogel. Stickstoffsammelnde Bakterien. Zentralbl. für Bakt., Abt. II, Bd. VIII, 1902 und: Weitere Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien. Zentrbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. IX, 1902.
- 14) Krzemieniewski S. Untersuchungen über *Azotobacter chroococcum* Beijer., Bull. de l'Acad. des Scienc. de Cracovie, Novembre 1908.
- 15) Krzemieniewska Helene. Der Einfluß der Mineralbestandteile der Nährlösung auf die Entwicklung des Azotobacters. Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Mai 1910.
- 16) Kaserer Hermann. Zur Kenntnis des Mineralstoffbedarfes von Azotobacter I. Zeitschr. für das landw. Versuchswesen Österreichs, Jahrg. XIV, 1911.
- 17) Remy Th. und Rösing G. Über die biologische Reizwirkung natürlicher Humusstoffe. Zentrbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. XXX, 1911.
- 18) Christensen Harald R. und Larsen O. H. Untersuchungen über Methoden zur Bestimmung des Kalkbedürfnisses des Bodens. Zentrbl. f. Bakter., Abt. II, Bd. XXIX, 1911.
- 19) Omielański W. L. und Sewerowa P. O. Die Pigmentbildung in Kulturen des *Azotobacter chroococcum*. Zentrbl. für Bakter., Abt. II, Bd. XXIX, 1911.
- 20) Stoklasa Julius. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch *Azotobacter* und *Radiobacter*. Zentrbl. für Bakt., Abt. II, Bd. XXI, 1908.
- 21) Löhnis F. und Pillai N. K. Über stickstofffixierende Bakterien. III. Zentrbl. für Bakt., Abt. II, Bd. XX, 1908.
- 22) Prażmowski Adam. Historia rozwoju i morfologia azotobaktera (*Azotobacter chroococcum* Beijer.). Wiadomość tymczasowa. Rozprawy Wydz. matem.-przyrodn. Akad. Umiej. w Krakowie, Grudzień 1911.
- 23) Prażmowski Adam. Morphologie und Cytologie des *Azotobacter chroococcum* Beijer. Vorl. Mitt. Zentrbl. für Bakter., Abt. II, Bd. XXXII, 1912.
- 24) Prażmowski Adam. O tworzeniu się zarodników u bakteryj. Rozpr. i sprawozd. Wydz. matem.-przyrod. Akad. Umiej. w Krakowie, 1888. S. auch kurzes Autorefer. dieser Arbeit im Biolog. Zentralbl. Bd. VIII, 1888.
- 25) Migula W. System der Bakterien, Bd. I, Allg. Teil. Jena, 1897.
- 26) Hiltner L. und Störmer K. Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger. Arbeiten aus d. biol. Abteil. für Land- u. Forstwirtschaft am kais. Gesundheitsamte, Bd. III, 1908.
- 27) Heinze Berthold. Über die Bildung und Wiederverarbeitung von Glykogen durch niedere pflanzliche Organismen. Zentrbl. für Bakter., Abt. II, Bd. XII, 1904 u. Bd. XIV, 1905.



- 28) Winogradsky S. *Clostridium Pastorianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. Zentrbl. f. Bakter., Abt. II, Bd. IX, 1902.
- 29) Rayman Bohuslav et Kruis Karel. Des noyaux des bactéries. Bull. internat. de l'Acad. des Sciences de l'Emp. Francois Joseph I. Prague 1904.
- 30) Kohl F. G. Über das Glykogen und einige Erscheinungen bei der Sporulation der Hefe. Berichte d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. XXV, 1907.
- 31) Guillermond A. Le noyau des levûres. Annal. mycol. 1904.
- 32) Guillermond A. Remarques critiques sur différentes publications parues récemment sur la cytologie des levûres et quelques observations nouvelles sur la structure de ces champignons. Zentrbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. XXVI, 1910.
- 33) Meyer Arthur. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg., Jahrg. 62, 1904.
- 34) de Bary A. Vorlesungen über Bakterien, Leipzig 1885.
- 35) Schaudinn Fritz. Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen. Archiv für Protistenkunde, Bd. I, 1902.

### Erklärung der Tafeln.

Sämtliche Zeichnungen sind von freier Hand aufgenommen, daher die angegebenen Vergrößerungen nur approximativ. Vergrößerungen über 1000:1 beziehen sich auf Zeiss Apochromat-Immersion 2 mm und Kompensationsokulare 8 und 12, darunter zum Teil auf Immersion 2 mm, zum anderen Teil auf Trockensysteme E und F und Kompensationsokulare 6–12.

#### Tafel VII.

Fig. 1. Eine Gruppe von vegetativen Stäbchen aus einer jungen Tropfenkultur (4–5 Stunden nach Auskeimung der Sporen). Vergr. 1040.

Fig. 2. Die aufeinander folgenden Teilungsstadien (*a–f*) eines Doppelstäbchens ( $\alpha$  und  $\beta$ ) aus einer Tropfenkultur. Zwischen *a* und *f* ist etwas über eine Stunde verflossen. Vergr. 1000.

Fig. 3. Faden (*a*) und zu Fäden auswachsende Stäbchen (*b*) aus einer Tropfenkultur. Die Zahlen über *b* bezeichnen die Beobachtungszeit. Die Pfeilchen bedeuten, daß die Stäbchen davongeschwärmt sind. Vergr. 1040.

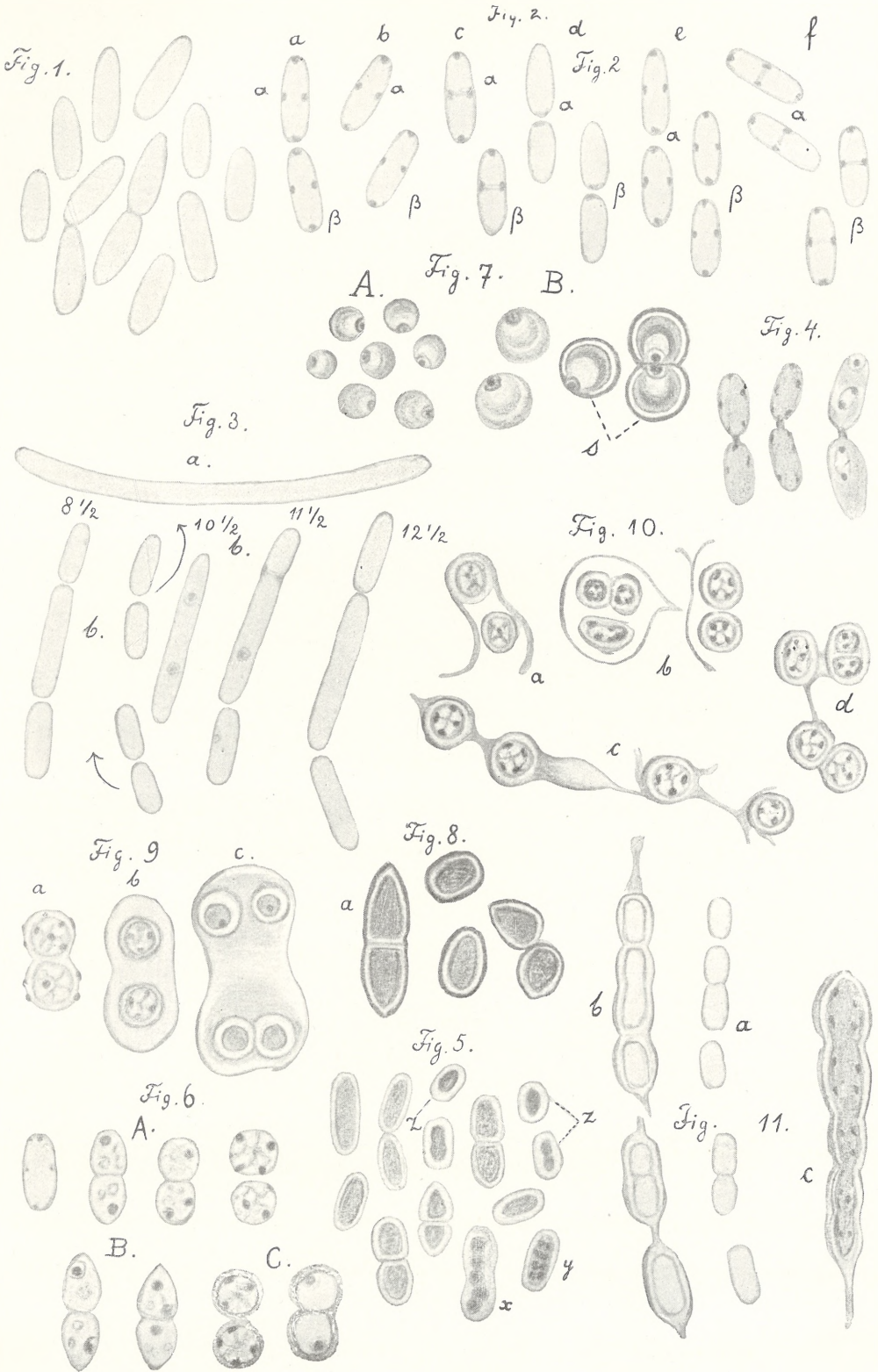
Fig. 1–3 *in vivo* aufgenommen, die folgenden 4–11 nach Behandlung mit verdünnten Lösungen von Methylblau oder Fuchsin-Methylgrün.

Fig. 4. Drei Doppelstäbchen mit der die Schwesterstäbchen noch verbindenden Schleimbrücke der äußeren Membran. Vergr. verschieden.

Fig. 5. Vegetative Stäbchen, zum Teil in Kokken übergehend, mit diffus verteilter Kernsubstanz und doppelt konturierten Membranen. Bei *x* und *y* sieht man die stark vergrößerte und in Auflösung befindliche Chromatinsubstanz der Zellkerne; bei *z*, daß die kokkusartigen Zellen vor jeder Teilung sich verlängern. Vergr. 1000–1500.

Fig. 6. Übergang der vegetativen Stäbchenformen in die fruktifikativen Kokkusformen. A gewöhnliche normale Formen, B geschnäbelte Übergangsformen,



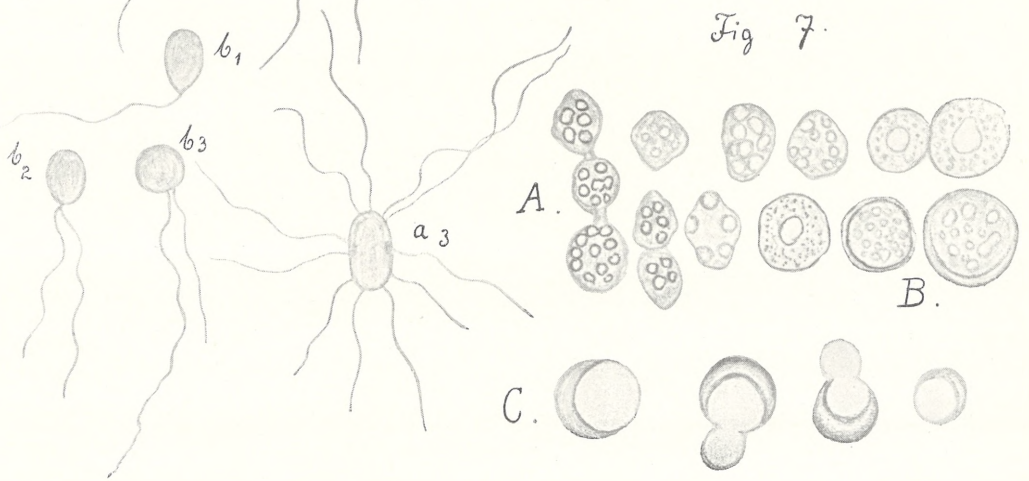
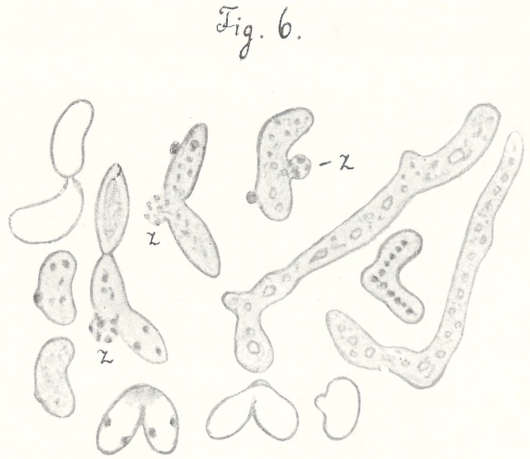
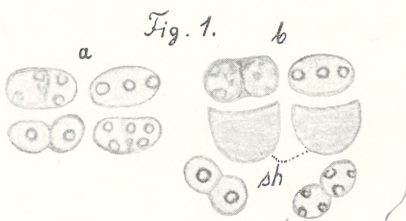
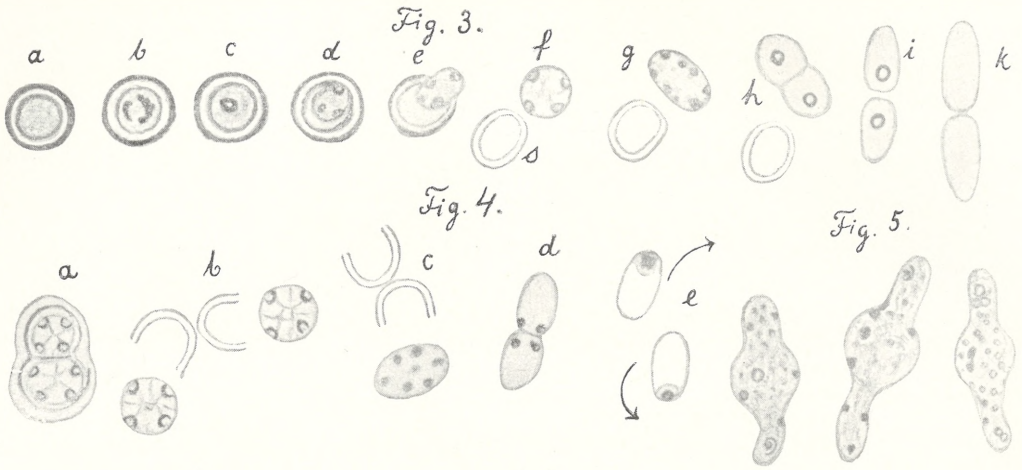


A. Prażmowski.









A. Prażmowski.







Fig. 1.

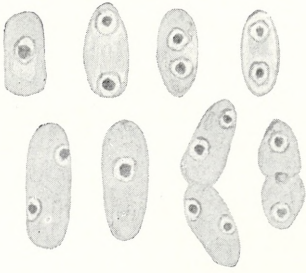


Fig. 2.

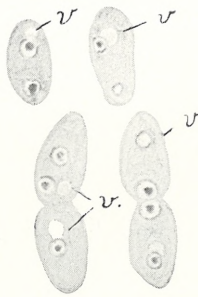


Fig. 3.



Fig. 4.

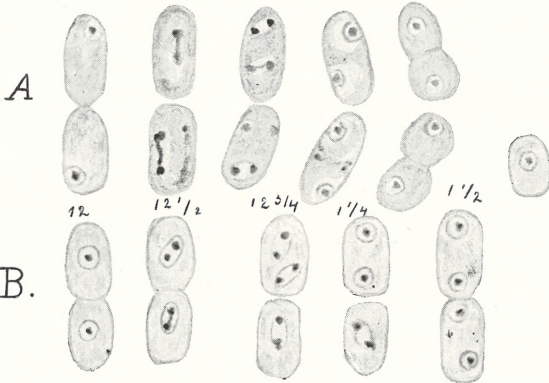


Fig. 5.

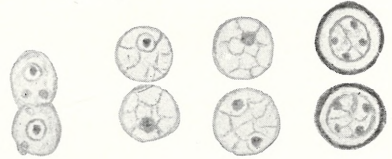


Fig. 6.

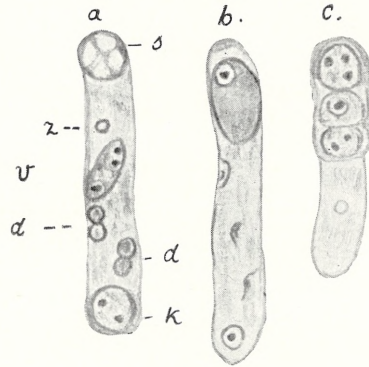


Fig. 7.

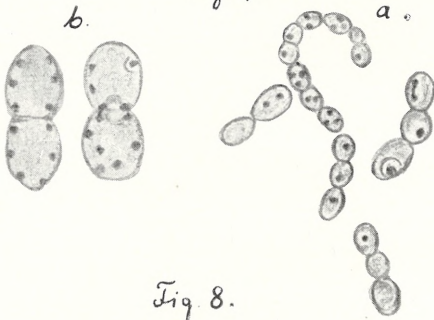


Fig. 8.

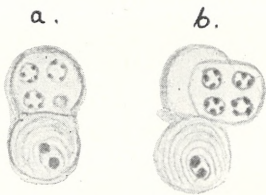
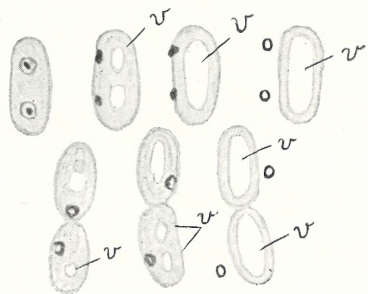


Fig. 9.



A. Prażmowski.







*C* zeigt die Verschleimung der Mutterzellmembran, wodurch erst der Kokkus die Kugelform annimmt. Vergr. 1500.

Fig. 7. *A* Kokken mit exzentrisch gelegenen Zellkern und eigentümlich peripherisch angesammeltem Plasma an der dem Zellkern gegenüberliegenden Seite. Vergr. 720. In *B* dieselben stärker vergrößert, *s* Sporen oder sporenartige Formen dieser Kokken. Vergr. 1500.

Fig. 8. Sporen, welche sich direkt aus den vegetativen diffusen Nukleazellen entwickelt haben. Vergr. 1500.

Fig. 9. Drei Entwicklungsphasen eines zu einer Gallertkolonie sich entwickelnden Diplokokkus. *a* 1500 mal vergrößert. *b* und *c* 750.

Fig. 10. Auflösungszustände der Gallertkolonien; in *c* und *d* (unteres Paar) sind die Schleimhüllen bis auf kleine, zu fadenartigen Gebilden kollabierende Reste aufgelöst und die Sporen fast fertig gebildet; in *a* u. *b* sind die Gallert-hüllen noch teilweise erhalten. Vergr. 1500.

Fig. 11. Vegetative Stäbchen in Schleimhüllen. *a* eine Stäbchenkette unter gewöhnlichen Beobachtungsbedingungen; *b* dieselbe Stäbchenkette mit Methylenblau behandelt; *c* eine unsegmentierte Stäbchenkette nach Behandlung mit Fuchsin-Methylgrün. Vergr. *a* u. *b* 720, *c* 1000.

## Tafel VIII.

Fig. 1. Eine aus 8 Zellen bestehende Schleimkolonie, die Teilungen nach zwei Richtungen des Raumes zeigend; die äußere, gemeinsame Gallerthülle verquollen. In *b* dieselbe Kolonie wie in *a*, aber mit den aus dem unteren Zellenpaar herausgedrückten Diplokokken; *sh* die innere Schleimhülle. Mit Methylenblau gefärbt. Vergr. 1500.

Fig. 2. Geißeln der vegetativen (*a*) und fruktifikativen (*b*) Formen — nach Löffler's Methode gefärbt. In *a* sieht man die blasig abgehobene äußere Membran. Vergr. 1500.

Fig. 3. Die aufeinanderfolgenden Stadien der Sporenkeimung bis zur Ausbildung der vegetativen Formen (*ik*). Die Zeichnung ist aus zahlreichen direkten Beobachtungen in Tropfenkulturen zusammengestellt, um ein einheitliches Bild der Entwicklung zu geben. Erklärung der einzelnen Entwicklungsphasen s. Text. Vergr. 1500.

Fig. 4. Keimung der Gallertkolonienkokken (Wassersporen). Es sind nur die wichtigsten Stadien wiedergegeben, die intermediären weggelassen. Die Pfeilchen bedeuten das Davonschwärmen der Stäbchen. Vergr. 1500.

Fig. 5—7: Involutionsformen, mit Fuchsin-Methylgrün gefärbt.

Fig. 5. Drei absterbende Stäbchen, in der Mitte kugelförmig aufgebläht. Agarkultur mit reinem  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Vergr. 1000.

Fig. 6. Stäbchen- und fadenförmige Involutionsformen aus Glukosenährlösung auf Leitungswasser mit Zusatz von  $1,5\text{‰}$   $\text{CaCO}_3$ . Die dunkel schraffierten nach Behandlung mit Methylenblau. An einzelnen Stäbchen *x* sieht man Aussprossungen des Inhalts, an anderen das Austreten der Chromatinkörner (Chromidien). Vergr. 1000.

Fig. 7. *A* sporangienartige Involutionsformen aus verschiedenen Nährlösungen (vorwiegend Beijerinck'sche Mannitnährlösung) mit stark lichtbrechenden



Körnchen, z. T. mit Vakuolen; *B* ebensolche aus Gallertkolonien entstanden; *C* hefeartige Kugelformen aus einer Tropfenkultur. Vergr. 1000.

## Tafel IX.

Sämtliche Figuren dieser Tafel sind bei einer Vergrößerung von 1500 (Zeiss Apochr. Immersion 2 mm, Okular 12) aufgenommen worden; Fig. 2, 3, 6, 7, 9 nach Färbung, die übrigen *in vivo*.

Fig. 1. Vegetative Stäbchen mit Individual-Zellkernen.

Fig. 2. Desgleichen, aber gefärbt mit Fuchsin-Methylgrün, zum Teil mit Vakuolen.

Fig. 3. Eine Gruppe von vegetativen Stäbchen und Übergangsformen mit zum größten Teil in Teilung begriffenen Zellkernen. Gefärbt nach Rayman und Kruis.

Fig. 4. Zellkernteilungsbilder, aufgenommen auf Grund direkter ununterbrochener Beobachtung in Tropfenkulturen. Die Zahlen bezeichnen die Beobachtungszeit.

Fig. 5. Die Zellkernveränderungen im Fruktifikationsstadium.

Fig. 6. Drei involutive Stäbchen, welche aus den Zellkernen, resp. Chromidien regenerative Kokken und Stäbchen entwickelten. In *a* sieht man bei *n* einen desorganisierten Zellkern, *kk* sind zwei winzige Diplokokken, *v* ein in Teilung begriffenes vegetatives Stäbchen mit zwei Individualzellkernen, *s* und *k* sporulierende Kokken; in *b* ist ein einziges großes Stäbchen mit Individualzellkern entstanden; in *c* haben sich drei sporulierende Kokken entwickelt.

Fig. 7. Regenerative Mikro-Azotobacterkokken (*a*) und Übergangsformen (*b*) von normaler Größe aus derselben Kultur wie die Stäbchen *a*, *b*, *c* in Fig. 6.

Fig. 8. Ein Diplokokkus aus einer absterbenden Kultur in Beijerinck'scher Mannitnährlösung. In der oberen Zelle (*a*) sieht man Anfänge einer Kokkenentwicklung aus den Zellkernen, resp. Chromidien; in *b* dieselbe Zelle aus der Hülle durch gelinden Druck herausgedrückt. Die untere Zelle zeigt einen in Teilung begriffenen Zellkern und eine eigentümliche Schichtung des übrigen Inhalts, welche an die in Fig. 7, Taf. VII, dargestellten Strukturen lebhaft erinnert; sie ist zweifellos degenerativ.

Fig. 9. Das Ausstoßen der Zellkerne aus absterbenden vegetativen Stäbchen. Aus einer Tropfenkultur mit Vaselineverschluß.



*Zarys teoryi chemicznej zjawisk hemolizy i hemaglutynacyi. — Versuch einer chemischen Theorie der Hämolyse und der Hämagglutination.*

Note

de **M. J. DUNIN-BORKOWSKI,**

présentée par M. N. Cybulski m. t. dans la séance du 3 Mars 1912.

Die heute als Hämolyse bezeichneten Erscheinungen waren schon vor hundert Jahren bekannt, ohne jedoch irgend ein Interesse zu erwecken, da es im allgemeinen als natürlich betrachtet wurde, daß unter der Einwirkung von Wasser und Alkalien eine Zerstörung der roten Blutkörperchen erfolgt, wobei das Blut lackfarben wird.

Diese Eigentümlichkeit des Blutes wurde auch als Austritt des Hämoglobins aus den Blutkörperchen bezeichnet, und die Aufmerksamkeit der Forscher wurde erst dann auf diese Erscheinung gelenkt, als man die sogenannten osmotischen Eigenschaften des Blutes kennen gelernt hatte.

Bekanntlich hat sich Hamburger der roten Blutkörperchen zur Feststellung der Isotonie und des isotonischen Koeffizienten der Lösungen bedient. Die Lösungen, in welchen die Blutkörperchen eben aufhörten, das Hämoglobin zu verlieren (d. h. wo sie keine Hämolyse mehr aufwiesen), wurden als isotonisch betrachtet.

Hamburger<sup>1)</sup> deutet seine Versuche folgendermaßen: „Fragt man, wie es zu erklären ist, daß die isotonischen Koeffizienten von de Vries bei den Blutkörperchen wiedergefunden werden, so ist die Antwort mit Hilfe der folgenden Hypothese nicht schwer zu geben. Stellen wir uns vor, das Blutkörperchen bestände aus einem protoplasmatischen Netz, in dessen Maschen sich ein gefärbter, mehr oder weniger flüssiger Inhalt befindet. Dann ist es ausschließlich dieser intraglobulare Inhalt, welcher die wasseranziehende Kraft des

<sup>1)</sup> Osmotischer Druck und Ionenlehre in den med. Wissenschaften, B. I, S. 167.



Blutkörperchens repräsentiert; das protoplasmatische Netz ist daran nicht beteiligt. — Weiter stellen wir uns vor, daß die äußere protoplasmatische Begrenzung permeabel für Wasser sei, nicht aber für die genannten Kristalloide“.

Es läßt sich also nach Hamburger's Ansicht das Auftreten der Hämolyse im Falle der fehlenden Isotonie folgendermaßen erklären: In einer hypotonischen Lösung zieht das Blutkörperchen so lange Wasser an, bis sein Inneres denselben osmotischen Druck wie die umspülende Flüssigkeit erreicht hat; ist der osmotische Druck der umgebenden Flüssigkeit niedrig, dann quillt das Blutkörperchen an und verliert sein Hämoglobin.

Wir sehen also, daß die Theorie des osmotischen Druckes den ersten Erklärungsversuch des Mechanismus der hämolytischen Erscheinungen darstellt. Sie vermag aber nicht zu erklären, warum eine ganze Reihe von Salzen trotz der Einhaltung des isotonischen Gleichgewichts hämolytisch wirkt.

Gryns<sup>1)</sup> hat deswegen die Annahme gemacht, daß die Blutkörperchen für gewisse Salze durchlässig sind und daß die in die Blutkörperchen eindringenden Salze die hämolytische Wirkung entfalten. Gryns stellt sogar zwei folgende Regeln auf:

- 1) Salze mit einem Metallion treten nicht durch;
- 2) eine Verbindung dringt nicht durch, wenn auch nur einer ihrer Ionen nicht durchdringen kann.

In dieselbe Kategorie von Ansichten, die ich als osmotische Theorien der Hämolyse bezeichnen möchte, gehören auch die Arbeiten von Köppe<sup>2)</sup>. Nach diesem Verfasser „sind die roten Blutkörperchen von einer halbdurchlässigen Wand umgeben, die Zerstörung der halbdurchlässigen Wand macht die roten Blutscheiben lackfarben“. Diese halbdurchlässige Membran ist nach Köppe mit höchst mannigfaltigen Eigenschaften ausgestattet. „Eine solche halbdurchlässige Wand kann durch Wärme schmelzen, durch Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Äther u. s. w. sich auflösen, durch Wasserstoffionen katalysiert, durch Hydroxylionen verseift werden“.

Von den angeführten Ansichten enthalten nur die Gryns'schen Regeln experimentell kontrollierbare, wenn auch unrichtige<sup>3)</sup> Sätze.

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, B. 63, S. 107.

<sup>2)</sup> Pflüger's Archiv, B. 99, S. 80.

<sup>3)</sup> J. Dunin-Borkowski. Über die hämolytische Wirkung von Quecksilbersalzen. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie, 1908, S. 494.



Die anderen Autoren schreiben den roten Blutkörperchen die verschiedensten Eigenschaften zu. Durch die größte Willkür zeichnen sich die Annahmen von Köppe aus. Was hat eigentlich die Katalyse einer halbdurchlässigen Membran zu bedeuten? Soll das ein Untergang, ein Zerfall sein, oder aber eine Verbindung der Bestandteile der Membran untereinander? Warum sollen die Wasserstoffionen katalytisch wirken? Ein einfaches Experiment beweist doch, daß im hämolytischen Prozeß fast die ganze Menge der Säure gebunden wird<sup>1)</sup>, so daß von einer Katalyse gar keine Rede sein kann.

Die Entdeckung der hämolytischen Sera durch Bordet hat den hämolytischen Fragen eine hervorragende praktische Bedeutung gegeben; das Wesen der Hämolyse erscheint aber durch diese Entdeckung nur um so mehr verwickelt und noch schwerer verständlich. Und dies war durchaus natürlich: wenn wir die roten Blutkörperchen mit einem Ag- oder Hg-Salz hämolsieren, dann haben wir mit einer streng definierten chemischen Verbindung zu tun, während das Serum zwei hypothetische Substanzen enthält, von denen keine an und für sich irgend eine Wirkung auf das Blutkörperchen auszuüben vermag. Die Theorien der Wirkung der hämolytischen Sera sind gewissermaßen mit den Immunitätstheorien verknüpft. Die französische Schule unter der Führung Bordet's mißt dem Amboceptor eine sensibilisierende Wirkung bei, genau so wie die Beize den zu färbenden Körper empfindlich macht. Die deutsche Schule erklärt die hämolytische Wirkung der Blutsera im Sinne der Ehrlich'schen Seitenkettentheorie.

Die hämolytische Wirkung der chemischen Substanzen erklärt Ehrlich<sup>2)</sup> durch eine Vergiftung der Blutkörperchen. Er nimmt an, „daß in den Erythrocyten ein eigenartiges Protoplasma, das Discoplasma vorhanden ist, dessen Hauptfunktion darin besteht, den Austritt von Hämoglobin in das Blutplasma zu verhindern. Wird das Discoplasma abgetötet, so folgt sofort die Diffusion des Hämoglobins, d. h. das Blut wird lackfarben“.

Wir sehen also, daß bis jetzt nicht einmal ein Versuch zur Aufstellung einer allgemeinen Theorie der hämolytischen Phänomene gemacht wurde, welche die Wirkung von so differenten Faktoren

<sup>1)</sup> J. Dunin-Borkowski. Sur l'absorption des substances hémolytiques et agglutinantes. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie 1910, S. 608.

<sup>2)</sup> Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung, S. 555.



zu erklären vermöchte, wie Wasser, Alkalien, Säuren, Salze der schweren Metalle und Hämolyse.

Um den Chemismus der hämolytischen Reaktionen zu ergründen, untersuchten wir in Gemeinschaft mit Dr. Szymanowski<sup>1)</sup> die Wirkung fast aller anorganischen Salze auf die roten Blutkörperchen und gelangten zu dem Ergebnis, daß sehr viele Verbindungen ausschließlich agglutinierend wirken, während andere in schwachen Konzentrationen hämolysieren, in stärkeren agglutinieren; außerdem haben wir in der Kombination von Cyankali und Borsäure eine Analogie mit der Wirkung der hämolytischen Blutsera nachweisen können.

Aber weder diese Analogie noch eine ganze Reihe von Tabellen haben zur Aufdeckung irgendwelcher allgemeinen Regeln oder Zusammenhänge zwischen der Hämolyse und den chemischen Valenzen oder Affinitäten geführt. Es hieß tiefer greifen und die quantitativen Verhältnisse im Verlauf der Hämolyse und der Agglutination prüfen.

Ich habe mich der Aufgabe unterzogen, die bei der Hämolyse und bei der Agglutination gefundenen Substanzmengen zu bestimmen. Diese Untersuchungen<sup>2)</sup> haben ergeben, daß die Bindung der Silber-, Quecksilber- und Kupfersalze durch die roten Blutkörperchen streng nach den Gesetzen der Adsorption erfolgt, daß aber die Erscheinungen der Hämolyse und der Agglutination nicht immer mit Adsorption Hand in Hand einhergehen; die Eisen- und Bleisalze (Bleinitrat) werden z. B. von den Blutkörperchen gar nicht gebunden.

Die genannten Versuche haben die Frage der Agglutination soweit geklärt, daß z. B. der Satz aufgestellt werden konnte<sup>3)</sup>, daß „diejenigen Körper, welche agglutinierend wirken, adsorbiert werden oder Eiweiß zu fällen vermögen“.

Diese Regel vermag z. B. vorausszusehen, daß solche hämolysierende Verbindungen, wie Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester, auf die Blutkörperchen eine agglutinierende Wirkung ausüben müssen. Die von Dr. Eiger<sup>4)</sup> mit Äthyl- und Methylalkohol, sowie mit Azeton

1) Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie 1909. S. 746.

2) Sur l'absorption, a. a. O.

3) J. Dunin-Borkowski. Zur Theorie der Hämagglutination. Internationaler Physiologen-Kongreß, 1910.

4) Zeitschrift für Immunitätsforschung, B. 9, S. 239.



angestellten Versuche haben bewiesen, daß diese Körper tatsächlich in höheren Konzentrationen auf die Blutkörperchen agglutinierend wirken.

Schon längst suchten viele Forscher, einen Zusammenhang zwischen der Fällung der Eiweißkörper und der Agglutination nachzuweisen. Es ließ sich aber kein Parallelismus zwischen der Eiweißfällung einerseits und der Agglutination der roten Blutkörperchen andererseits feststellen. Der Vorgang der Agglutination weist nämlich gewisse spezifische Eigentümlichkeiten auf, wie aus dem folgenden Beispiel zu ersehen ist. Nehmen wir z. B. 2 ccm Blutkörperchen, aufgeschwemmt in 50 ccm physiologischer Lösung von  $\text{NaNO}_3$ ; zur Agglutination sind 3 ccm  $\frac{1}{10} n$  Silbernitratlösung notwendig; um dieselbe Menge Blutkörperchen mit Eisenchlorid zu agglutinieren, müssen wir 15 ccm einer  $\frac{1}{10} n$  Lösung nehmen. Dieser Versuch beweist uns deutlich, daß das Silber unvergleichlich stärker agglutiniert als das Eisen (besonders, da in diesen Versuchen die 3 ccm  $\frac{1}{10} n$   $\text{AgNO}_3$  und die 15 ccm  $\frac{1}{10} n$   $\text{FeCl}_2$  schon in den 50 ccm mitgerechnet sind).

Wenn wir aber die quantitativen Verhältnisse in der Wirkung dieser beiden Verbindungen berücksichtigen, dann werden wir zum diametral entgegengesetzten Schluß geführt. Es ergibt sich nämlich, daß nach Zusatz von 3 ccm Silbernitrat 2·36 ccm davon momentan adsorbiert werden, während das Eisenchlorid gar nicht adsorbiert wird. Da sich die Erscheinung der Adsorption durch Anhäufung der betreffenden Substanz an der Oberfläche des adsorbierenden Körpers auszeichnet, so folgt daraus, daß bei der Silberagglutination die Blutkörperchen von 0·118  $\frac{1}{n}$   $\text{AgNO}_3$ , bei der Eisenagglutination von 0·03  $\text{FeCl}_2$  umgeben sind. Es ist nunmehr klar, daß  $\text{FeCl}_2$  viel stärker agglutiniert als  $\text{AgNO}_3$ . Wir sehen auch, wie eine die Mengenverhältnisse nicht berücksichtigende Untersuchung zu irrigen Schlüssen führen kann. Indessen wurden in sämtlichen Arbeiten über Hämolyse und Agglutination nicht nur die quantitativen Verhältnisse, sondern auch die chemische Beschaffenheit der einzelnen Bestandteile der Blutkörperchen unbeachtet gelassen. Man pflegte statt dessen verschiedene Hypothesen über Blutkörperchenstruktur in den Vordergrund zu setzen und höchstens auf die Eigenschaften der Eiweißkörper Rücksicht zu nehmen. Die Aufgabe der vorliegenden Abhandlung bildet die Betrachtung der Erscheinungen der Hämolyse und der Agglutination vom Standpunkte der chemischen



Beschaffenheit sämtlicher Bestandteile des roten Blutkörperchens. Wir wollen beginnen mit den einfachsten Erscheinungen in der Hämolyse, mit der Wirkung des Wassers und der hypotonischen Lösungen. Nehmen wir zwei parallele und gleiche Reihen von NaCl-Lösungen: 0·1%, 0·2%, 0·3%, 0·4%, 0·5%, 0·6%, 0·7% und 0·8%. Jedes Röhrchen der ersten Reihe wird beschickt mit je 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung, jedes der anderen mit je 1 ccm Hühnereiweiß (Eierklar). In der ersten Reihe tritt die Hämolyse um so schwächer auf, je höher die Konzentration von NaCl ist, bei 0·7% NaCl fehlt sie vollständig und die Flüssigkeit über den Blutkörperchen ist ganz farblos. In der zweiten Reihe werden die Globuline in kleinen Flöckchen ausgefällt, mit dem Anstieg der Konzentration in immer geringerer Menge; bei 0·7% NaCl fallen sie nicht mehr aus und die Eiweißemulsion ist vollkommen durchsichtig<sup>1)</sup>. Wenn wir NaNO<sub>3</sub> statt NaCl nehmen, erhalten wir dasselbe Resultat mit dem einzigen Unterschied, daß sich der Grenzpunkt bis 0·9% NaNO<sub>3</sub> verschiebt.

Es folgt aus diesen Experimenten, daß sowohl im Eiereiweiß wie in den Blutkörperchen das gleichzeitige Bestehen von verschiedenen Eiweißkörpern in ihren natürlichen Beziehungen durch die Anwesenheit einer streng bestimmten Menge von Salzen bedingt ist.

Wenn ein Blutkörperchen mit Wasser zusammentrifft, fällt Globulin aus, die chemische Zusammensetzung des Blutkörperchens wird dadurch gestört, es zerfällt (hämolysiert). Da der Globulingehalt der Blutkörperchen äußerst gering ist, und da in demselben Salze enthalten sind, so ist diese Erscheinung im Verlauf der Hämolyse fast unsichtbar. Dennoch läßt sich bei der Wasserhämolyse von gründlich mit Zuckerlösung gewaschenen Blutkörperchen (bei großer Flüssigkeitsmenge) ein deutlicher Globulinniederschlag nachweisen. Wir werden weiter sehen, daß bei der Alkoholhämolyse sich vor allen Dingen der Globulinaustritt aus den Blutkörperchen bemerkbar macht. Die genannten Versuche vermögen, den bisher unaufgeklärten Beobachtungen von Gryns eine Deutung zu geben. Gryns hat nämlich gefunden, daß Blutkörperchen in isotonischer Harnstofflösung augenblicklich hämolysieren; wenn aber zu den in

<sup>1)</sup> Die Globulinausfällung kann genauer festgestellt werden bei vorsichtiger Überschichtung des Eierklars mit der Lösung, indem wir an der Grenze einen Ring entstehen sehen.



physiologischer NaCl-Lösung suspendierten Blutkörperchen Harnstoff *in substantia* zugesetzt wird, dann kann seine Konzentration sogar 10% erreichen, ohne irgend eine Spur von Hämolyse auszulösen. Den Versuch von Gryns vermag die osmotische Theorie nicht zu erklären, wohl aber ist der Schlüssel im Verhalten der Globuline in bezug auf Harnstoff zu finden; tatsächlich erzeugt die Harnstofflösung, zum Eiweiß zugesetzt, eine sofortige Ausscheidung von Globulinen. Wird aber fester Harnstoff zur Eiweißsuspension in physiologischer NaCl-Lösung zugesetzt, dann fallen die Globuline gar nicht aus und die Suspension bewahrt ihre Durchsichtigkeit.

Als hämolytische Faktoren betrachtet man gewöhnlich die elektrischen Entladungen, das Einfrieren und Erhitzen (bis 59°) der Blutkörperchen. Dieselben Faktoren führen auch in einer Suspension von Eiereiweiß die Entstehung von kleinen Flöckchen herbei. Es sei gleich bemerkt, daß sich die elektrischen Entladungsversuche am besten in kleinen Eprouvetten anstellen lassen, welche mittels eines in der Mitte angebrachten horizontalen Röhrchens miteinander verbunden sind. Die beiden Eprouvetten werden bis über das Querstückniveau mit Eierklar gefüllt, welches vorsichtig mit physiologischer NaCl-Lösung überschichtet wird; bereits nach 10 Minuten langer Wirkung eines Induktoriums (von 1 cm Funkenlänge) sehen wir weiße Flöckchen in den oberen Partien der unteren Schicht auftreten. In den Gefrierversuchen muß die Kälte Wirkung wenigstens dreimal wiederholt werden.

Ähnlich wie die genannten rein physikalischen Faktoren wirkt Alkohol und Azeton. Wenn wir z. B. 10 ccm einer 2%-igen Blutkörperchenaufschwemmung vorsichtig mit 1½ ccm Alcohol abs. überschichten, indem wir vorsichtig die Vermischung der beiden Flüssigkeiten vermeiden, so sehen wir aus den Blutkörperchen einen weißen Niederschlag in der Gestalt eines Ringes austreten, unter welchem sich nach und nach eine rote Flüssigkeit ansammelt (Hämolyse); über dem Ring befindet sich der durchsichtige Alkohol, und endlich die tiefste Schicht in der Eprouvette besteht aus intakt gebliebenen Blutkörperchen. Bei vorsichtigem Schütteln der Eprouvette nimmt die Stärke des weißen Ringes, sowie der durchsichtigen roten Zone zu. Wenn wir so weiter vorgehen, können wir schließlich eine beträchtliche Stärke des weißen Ringes erreichen, bis es schließlich nach endgültiger Durchmischung zur kompletten Hämolyse kommt und der weiße Niederschlag nach und nach auf



den Boden der Eprouvette fällt. Wenn wir aber den Versuch in der Weise anstellen, daß wir sofort nach Zusatz von Alkohol den ganzen Inhalt der Eprouvette kräftig durchmischen, dann werden wir lediglich eine komplette Hämolyse (ohne Niederschlagbildung) erzielen.

Ein ganz ähnliches Verhalten in bezug auf Alkohol weist die Eierklarsuspension auf.

Wir gehen nun zu solchen hämolytischen Verbindungen über, welche mit Eiweiß leicht lösliche Verbindungen bilden; es gehören hierher die Basen und die Säuren. Es ist leicht einzusehen, daß, wenn ein Bestandteil des Blutkörperchens eine Verbindung mit einer Base oder Säure eingeht (Azidalbuminate und Alkalialbuminate), das Blutkörperchen als Ganzes eine Schädigung erleidet und zerfällt, was wir als Hämolyse wahrzunehmen pflegen.

Zu den stark mit Eiweiß reagierenden Stoffen gehören bekanntlich die Salze der Schwermetalle, welche gleichzeitig intensiv hämolytisch wirken.

Es ergibt sich, daß gewisse Salze ausschließlich hämolytisch wirken ( $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ,  $\text{HgJ}_2$ ), andere in schwachen Konzentrationen hämolysieren und in starken agglutinieren ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{PtCl}_4$ ,  $\text{AuCl}_3$ ), noch andere endlich ausschließlich agglutinieren ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ). Diese Mannigfaltigkeit in der Wirkung der Salze der Schwermetalle läßt sich von unserem Standpunkte leicht erklären. Wir stellen ähnlich wie oben mit Eiweiß und Blutkörperchensuspension gleichzeitig zwei parallele Versuchsreihen an.

Wenn wir irgendwelche Eiweißsuspension (Serum, Eierklar, Albumin) vorsichtig mit  $\text{HgCl}_2$  oder  $\text{AgNO}_3$  überschichten, dann sehen wir einen ringförmigen Niederschlag entstehen, welcher nach der Durchmischung verschwindet; wird  $\text{HgCl}_2$  in größerer Menge zugefügt, dann löst sich der Niederschlag nicht mehr auf. Es genügt aber, denselben Eiweißniederschlag im Überschuß zuzufügen, um den Niederschlag aufzulösen. Ähnlich verhalten sich sämtliche Eiweiß fällende Mittel. Bei Durchsicht der Literatur habe ich diese Erscheinung bereits von gewissen Autoren: Tappeiner<sup>1)</sup>, Robertson<sup>2)</sup> u. a. beschrieben gefunden. Bei der Prüfung der Wirkung

<sup>1)</sup> Pharmakologie, S. 37, 1901.

<sup>2)</sup> Über die Verbindungen der Proteine mit anorganischen Substanzen, Ergebnisse der Physiologie, 1910, S. 291.



der von  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  u. s. w. auf rote Blutkörperchen können wir eine vollständige Analogie mit den eingangs beobachteten Erscheinungen konstatieren.

Wenn wir dieselbe Menge von  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  u. s. w. zufügen, welche mit Eiweiß einen im Eiweißüberschuß löslichen Niederschlag bildet, werden wir Hämolyse erzeugen.  $\text{HgCl}_2$ , in der Eiweiß vollständig fallenden Menge zugefügt, agglutiniert die roten Blutkörperchen. Daraus ist zu schließen, daß im ersten Fall  $\text{HgCl}_2$ , einen Niederschlag auf der Oberfläche der Blutkörperchen bildet, welcher sich im Überschuß von demselben (in den Blutkörperchen vorhandenen) Eiweiß auflöst. Im zweiten Fall wird die Gesamtmenge von Eiweiß ausgefällt, von einer Auflösung kann keine Rede sein, und es tritt Agglutination auf. Es ist zu bemerken, daß sogar die bereits z. B. mit  $\text{HgCl}_2$  agglutinierten Blutkörperchen hämolysiert werden können, wenn nach Abpipettierung der Lösung neue Blutkörperchen zugesetzt werden.

Es ergibt sich weiter aus den genannten Versuchen, daß so schwer lösliche Salze, wie  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  und  $\text{HgJ}_2$  nur minimal eiweiß-fällend und demnach ausschließlich hämolytisch wirken können. Äußerst charakteristisch ist die Wirkung der letzten Gruppe der Salze der Schwermetalle, welche ausschließlich agglutinieren (Cu, Zn); sie bilden mit Eiweiß einen im Überschuß von Eiweiß löslichen Niederschlag und sie sollten demnach nach unserer Theorie hämolytisch wirken. Diese Salze haben aber neben der Eigenschaft, das Eiweiß zu fällen noch die Eigentümlichkeit, Hämoglobin zu präzipitieren<sup>1)</sup>. ( $\text{HgCl}_2$ , Ag-, Au- und Pt-Salze fällen das Hämoglobin nicht aus). Die Hämoglobinniederschläge lösen sich aber im Überschuß von Hämoglobin nicht auf und somit fehlt die Hämolyse. Man kann auf Grund dessen voraussagen, daß die sogenannten Alkaloidfällungsmittel der Eiweißkörper (Phosphorwolframsäure, Gerbsäure, Phosphoromolybdänsäure u. s. w.) hämolytisch unwirksam sind, da sie sämtlich Hämoglobin fällen; sie dürften dagegen sehr stark agglutinierend auf Blutkörperchen wirken.

Bis jetzt haben wir uns mit der Hämolyse und Agglutination mittels definierter chemischer Verbindungen beschäftigt. Wir müssen noch die Hämolsine in den Kreis unserer Betrachtungen vom Standpunkte unserer Theorie einbeziehen.

1) Fränkel, Deskriptive Biochemie, S. 406.



Als wir in Gemeinschaft mit Herrn Gieszezykiewicz<sup>1)</sup> die quantitativen Verhältnisse bei der Wirkung von hämolytischen Amboceptoren (inaktiviertes Serum eines mit Rindererythrocyten immunisierten Kaninchens) einer exakten Analyse unterwarfen, konnten wir feststellen, daß alle Amboceptoren agglutinierend wirken; sie müßten also nach unserer Theorie: 1) Niederschläge mit Blutkörperchenbestandteilen geben, 2) diese Niederschläge dürften sich im Überschuß der gefällten Substanz nicht auflösen, wohl aber im zugefügten Komplement.

Um uns zu überzeugen, ob es wirklich so ist, haben wir die folgende Versuchsreihe angestellt. In ein Röhrchen von 3 mm Durchmesser wurden 0·5 ccm Amboceptor (750 Einheiten) eingeschüttet und vorsichtig mit 0·5 ccm von mit Wasser hämolysierten Blutkörperchen überschichtet (1 ccm Blutkörperchen + 9 ccm Wasser), so daß sich zwei Schichten bildeten, die untere aus dem Amboceptorserum, die obere aus der hämolysierten Flüssigkeit bestehend. Nach einer Stunde bildete sich an der Grenze der beiden Schichten ein deutlicher Niederschlag. Er wurde mittels Zentrifuge am Boden desselben Röhrchens gesammelt und mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen; im Überschuß von hämolysierten Blutkörperchen löste er sich nicht auf. Dieses Experiment hat unsere Betrachtungsweise der Amboceptorwirkung im Sinne einer ausschließlichen Agglutination bestätigt.

Da der Amboceptor mit Komplement zusammen hämolytisch wirkt, so müßte man prüfen, ob sich der durch die Amboceptorwirkung verursachte Niederschlag im Komplement auflösen kann. Der in der bereits genannten Weise erhaltene Niederschlag wurde nun der Einwirkung des Komplements unterworfen; entsprechend unseren Hoffnungen hat sich der Niederschlag teilweise aufgelöst. Wir wollen aber gleich bemerken, daß ungefähr die Hälfte der Niederschläge im Komplement unaufgelöst geblieben ist<sup>2)</sup>.

Die teilweise Auflösung des Niederschlages im Komplement erklärt uns ohne jede Hilfhypothese die Wirkungsweise der hämolytischen Sera.

<sup>1)</sup> Verh. der Polnischen Naturforscher u. Ärzte, 1911.

<sup>2)</sup> Eine eingehende Untersuchung der genannten Niederschläge ist im Gange. Die Niederschläge sind untereinander nicht gleich; wir haben mit einer Reihe von Fällungsprodukten zu tun. Die Fällung vom Amboceptor mit dem Hämoglobin verhält sich ganz anders als die Fällung mit Eiweißkörpern.



Was geschieht aber mit dem ungelösten Teil des Niederschlages? In den gewöhnlichen hämolytischen Versuchen (1 Komplement-Einheit und 1 Amboceptor-Einheit) treten diese Niederschläge so spärlich auf, daß sie sich nicht bemerkbar machen; aber bei größeren Amboceptormengen (z. B. 100 Einheiten) sehen wir, daß die hämolytierte Flüssigkeit nicht klar und durchsichtig, sondern etwas trüb ist. Wir sehen also dieselben unlöslichen Niederschläge sowohl im hämolytischen wie im Präzipitationsversuch (Amboceptor + hämolytierte Flüssigkeit) auftreten.

Wenn wir zum hämolytischen Versuch einen großen Amboceptorüberschuß verwenden, bekommen wir eine Hemmung der Hämolyse. Die Hemmung der Hämolyse unter dem Einfluß vom Überschuß des Amboceptors oder die sogenannte Neisser-Wechsberg'sche Komplementablenkung suchten wir seinerzeit in Gemeinschaft mit Herrn Gieszczykiewicz<sup>1)</sup> im Sinne einer Agglutination der Blutkörperchen zu erklären. Diese Untersuchungen haben das Bestehen eines Zusammenhanges zwischen der Hemmung der Hämolyse und der Agglutination erwiesen, ohne aber einstweilen das Wesen der Hemmung zu erklären. Vom Standpunkte der chemischen Theorie ist die Hemmung der Hämolyse nicht nur leicht zu erklären, sondern sie ist sogar die logische Konsequenz der bereits auseinandergesetzten Tatsachen.

Wir haben bereits gesehen, daß dem Komplement die Rolle des Lösungsmittels, dem Amboceptor diejenige des Fällungsmittels zukommt. Es ist also leicht zu begreifen, daß bei Verwendung einer übermäßigen Amboceptormenge auf der Oberfläche der Blutkörperchen ein so reichlicher Niederschlag entsteht, daß die normale Komplementmenge nicht einmal zur Auflösung eines geringen Bruchteiles ausreichen kann, so daß die komplette Hämolyse ausbleiben muß.

Als eine weitere Konsequenz unserer Betrachtungsweise ist eine Zunahme der Hämolyse (nach vorausgegangener Hemmung) bei einer Steigerung der Komplementmenge zu erwarten. Der folgende Versuch zeigt, daß es tatsächlich so ist. Wenn wir zu 1 cem einer 5%-igen Blutkörperchenemulsion 1400 Amboceptoreinheiten zusetzen und nach Ablauf einer Stunde die Blutkörperchen durch Zentrifu-

<sup>1)</sup> J. D.-Borkowski u. M. Gieszczykiewicz. Über Neisser-Wechsberg'sche Komplementablenkung. *Bullet. de l'Acad. des Sc. de Cracovie* 1910, S. 746.



gieren auf den Boden des Röhrchens ausschleudern, die Flüssigkeit abheben, 0.1 ccm Komplement und physiologische Kochsalzlösung bis zur Auffüllung auf 3 ccm zusetzen, dann bekommen wir nur Spuren von Hämolyse (10% nach 2 Stunden, Brutschrank von 37° C.). Wenn wir dann noch 0.3 ccm Komplement zusetzen, steigt die Hämolyse auf 60%; bei Zusatz von weiteren 0.4 ccm auf 80%. Zur kompletten Hämolyse kommt es gar nicht. Die Blutkörperchen waren hier vom Komplementzusatz sehr stark agglutiniert und hatten 550 Amboceptoreinheiten gebunden. Unsere Annahme, daß diejenigen Stoffe, welche agglutinierte Blutkörperchen zu hämolysieren vermögen, gleichzeitig die Fähigkeit besitzen müssen, die dabei entstehenden Niederschläge (agglutinierend wirkender Stoff + Blutkörperchen) aufzulösen, wird bestätigt durch die folgende überaus charakteristische Tatsache. Bekanntlich haben wir in  $\text{HgCl}_2$  das einzige Eiweißfällungsmittel, dessen Niederschläge sich in der  $\text{NaCl}$ -Lösung auflösen; in vollständigem Einklang damit lösen sich die mit  $\text{HgCl}_2$  agglutinierten Blutkörperchen nicht in Säuren, Wasser und Zuckerlösungen, wohl aber in Kochsalz und im eigenen Serum auf<sup>1)</sup>. Es scheint uns somit, daß die von uns gegebene Erklärung der Hemmung der Hämolyse, die übrigens nur eine Konsequenz unserer ganzen Theorie bildet, nicht nur viel einfacher als die komplizierten Hypothesen von Ehrlich und Neisser-Wechsberg<sup>2)</sup>, sondern auch viel allgemeiner ist, indem sie mit der Gesamtheit der hämolytischen Prozesse in innigster Verbindung steht.

Wir wollen noch kurz die Präzipitinwirkung besprechen. Obwohl die Auseinandersetzung der Eigenschaften der Präzipitine über den Rahmen der vorliegenden Abhandlung hinausgeht, so steht sie doch insofern im Zusammenhange mit den uns hier beschäftigten Fragen, daß unsere chemische Theorie eine Agglutination der Blutkörperchen durch Präzipitine voraussetzen und postulieren muß. Ob es tatsächlich so ist, sollen erst künftige Experimente zeigen, für alle Fälle verlangt die genannte Konsequenz eine mit der ganzen Theorie und mit den bekannten experimentellen Tatsachen im Einklang stehende Erklärung der Hemmung der Präzipitation zu geben.

<sup>1)</sup> Hämolyse durch Hg-Salze, a. a. O. und Sachs, Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung, S. 237.

<sup>2)</sup> Die verschiedene Affinität des Komplementes zum ungebundenen und zum an Blutkörperchen gebundenen Amboceptor betreffend.



Wir wissen, daß ein Präzipitin, welches Eiweiß in einer Verdünnung von 1:100 fällt, keinen Niederschlag mit demselben auf 1:10 verdünnten Stoff gibt; wir haben hier mit einer Hemmung der Präzipitation zu tun. Diese von Halban und Landsteiner<sup>1)</sup> zuerst beobachtete Erscheinung haben später Eisenberg<sup>2)</sup> und andere bestätigen können. Alle haben diese Tatsachen übereinstimmend in dem Sinne erklärt, daß der sich bildende Niederschlag im Überschuß von Eiweiß aufgelöst wird. Eisenberg hat außerdem noch gefunden, daß das präzipitierende Serum, auf 72° erhitzt, nicht nur die präzipitierende Eigenschaft verliert, sondern noch einen deutlichen hemmenden Einfluß auf das aktive präzipitierende Serum ausübt. Diese hemmende Wirkung erklärt Eisenberg folgendermaßen: „Die Affinität der hemmenden Substanz zur präzipitablen ist größer als diejenige des Präzipitins. Am Präzipitin ist folglich eine labilere präzipitierende und eine stabilere haptophore Gruppe zu unterscheiden“.

Wir sehen also, daß Eisenberg in einer differenten Weise die Hemmung durch Eiweißüberschuß als die Hemmung durch inaktiviertes Serum erklärt. Die Erklärung der Präzipitationshemmung durch Eiweißüberschuß bestätigt vollauf die Richtigkeit unseres Prinzips. Indessen sollen sich im zweiten Fall (Hemmung durch Serum) nach unserer Ansicht die Präzipitinniederschläge im inaktivierten Serum auflösen. Da keiner der Autoren von Experimenten in dieser Richtung berichtet, sind bereits diesbezügliche Untersuchungen im Gange.

Zum Schluß möchte ich noch hinzufügen, daß zwar in der Mehrzahl der Fälle die Erscheinungen der Agglutination und Hämolyse durch den Eiweiß- und Hämoglobinehemismus bedingt sind, daß sie aber in gewissen Fällen ausschließlich mit den Eigenschaften von anderen Bestandteilen des Blutes, wie z. B. des Lecithins im Zusammenhange stehen. Als Beispiel möchte ich die Rizinwirkung nennen, welche ausschließlich agglutinierend ist.

Rizin gibt eine Fällung mit wasserhämolysierten Blutkörperchen, was uns überhaupt die agglutinierende Wirkung des Rizins erklärt. Da aber das Rizin keine Fällung, und zwar weder mit Eiweiß noch mit Hämoglobin, wohl aber mit (in Kochsalz suspendiertem) Lecithin in Gestalt von flockigem Niederschlag gibt, so unterliegt es

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1902.

<sup>2)</sup> Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie 1902. S. 289.



keinem Zweifel, daß die Fällung im wasserhämolytierten Niederschlag und somit auch die Agglutination selbst in diesem Fall auf den Gehalt der Blutkörperchen an Lecithin zurückzuführen ist.

Indem wir nun in einem allgemeinen Überblick die verwickelten Erscheinungen der Hämolyse und Hämagglutination zusammenfassen, gelangen wir zur Aufstellung folgender Sätze:

1. Diejenigen physikalischen Faktoren, welche das gleichzeitige Bestehen von verschiedenen Eiweißkörpern nebeneinander unter Beibehaltung der natürlichen Beziehungen unmöglich machen, üben hämolytische Wirkung aus. (Wasser, Wärme, elektrische Entladungen, Alkohol u. s. w.).

2. Stoffe, welche mit irgendwelchen Bestandteilen der Blutkörperchen lösliche Verbindungen eingehen, müssen hämolytisch wirksam sein (typisch für Säuren und Basen).

3. Eiweißfällende Mittel, welche sich im überschüssigen Eiweiß auflösende Niederschläge erzeugen, müssen in schwachen Konzentrationen hämolytisch, in stärkeren agglutinierend wirken.

4. Hämoglobin fällende Mittel wirken ausschließlich agglutinierend; Hämolyse kann dabei unmöglich vorkommen.

5. Der Wirkungsmechanismus der hämolytischen Sera besteht darin, daß der Amboceptor fällend, das Komplement den Niederschlag auflösend wirkt.

Zum Schluß möchte ich Herrn Univ.-Prof. Cybulski für das lebhafteste Interesse und sein stetiges Entgegenkommen, welches er bei der Ausführung dieser Untersuchungen bewiesen, auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank aussprechen.



*O chromoplastach w organach wegetatywnych. — Über  
Chromoplasten in vegetativen Organen.*

Mémoire

de M. **W. ROTHERT** m. e.,

présenté dans la séance du 4 Mars 1912.

Einleitung.

Unsere Kenntnis der Chromoplasten basiert fast ausschließlich auf den klassischen Untersuchungen Schimper's von 1885 (8 des Literaturverzeichnisses)<sup>1)</sup>. Nach diesem Autor kommen Chromoplasten in den männlichen Sexualorganen einiger Algen und Moose vor, bei den Phanerogamen sind sie in den Blüten und Früchten sehr verbreitet, deren gelbe und orange Farben meist, die roten zuweilen durch sie bedingt werden. Das Vorkommen von Chromoplasten in anderen Organen bezeichnet Schimper (S. 57) als Ausnahmefälle; abgesehen von einigen wenigen chlorophyllfreien Saprophyten und Parasiten und von der vorübergehenden Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten bei der winterlichen lokalen Verfärbung einiger Koniferen, weiß er nur zwei derartige Fälle zu nennen, nämlich 1) die orangerote Wurzel der Kulturform von *Daucus Carota*, 2) die fleischroten fertilen Sprosse von *Equisetum arvense* (S. 49, 108); dieses Objekt ist zugleich der einzige ihm bekannte Fall von Chromoplasten bei den Pteridophyten. Mehr ist, soviel ich weiß, auch heute über das Vorkommen von Chromoplasten in normalen vegetativen Organen nicht bekannt<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Auf die frühere, bei Schimper berücksichtigte Literatur brauche ich hier nicht einzugehen.

<sup>2)</sup> Erst als meine Untersuchungen abgeschlossen und größtenteils niedergeschrieben waren, wurde ich auf zwei Arbeiten aufmerksam, welche die Zahl der bekannten Fälle vermehren. Molisch (7) beobachtete rote Chromoplasten in Blättern von *Aloë*- und *Selaginella*-Arten, und Gentner (3) ebenfalls bei *Sela-*



Mir waren indeß schon vor vielen Jahren zwei weitere Fälle von Chromoplasten in vegetativen Organen bekannt geworden, nämlich rote Chromoplasten im Stengel einer *Selaginella* (als *S. arborea* bezeichnet) und gelbe im Blattstiel einer Palme (als *Areca Baueri* bezeichnet) welche im Gewächshaus des Botanischen Laboratoriums in Kasan kultiviert wurden. An diese Beobachtungen wurde ich erinnert, als ich am Beginn meines Aufenthaltes auf Java (im Jahre 1909) in Tjibodas eine Orchidee mit schön orange gefärbten Knollen bemerkte, welche ebenfalls Chromoplasten enthielten. Ich begann nach solchen Objekten zu suchen, und da der Erfolg meine Erwartungen überstieg und die genauere Untersuchung manche interessante Beobachtungen ergab, gestaltete sich das Studium der „vegetativen“ Chromoplasten zu meiner hauptsächlichen Aufgabe während meines Aufenthaltes in Buitenzorg. Es zeigte sich, daß Chromoplasten in vegetativen Organen, wenn auch relativ eine seltene Erscheinung, doch bei absolut recht zahlreichen Objekten aus allen Klassen der höheren Pflanzen vorkommen, wenigstens in den Tropen. Einige weitere ähnliche Objekte fand ich dann noch während meines Aufenthalts in Ceylon, ein Objekt in Ober-Ägypten und später noch eine Anzahl in den Gewächshäusern in Kew und in Krakau. Die Zahl der Spezies, bei denen ich Chromoplasten in vegetativen Organen gefunden habe, beträgt nahezu 200 aus 42 Familien und ich zweifle nicht, daß diese Zahl bei weiteren Nachforschungen sich noch erheblich würde vermehren lassen<sup>1)</sup>.

Von der Untersuchung waren ausgeschlossen: 1) außer Blüten und Früchten im morphologischen Sinn auch alle Teile, welche biologisch zu jenen in solcher Beziehung stehen, daß sie zu dem „Schauapparat“ gerechnet werden können, 2) gelbblättrige, gelbscheckige und gelbstreifige Gartenformen von normal grünen Pflanzen, 3) die dem Absterben vorausgehende Verfärbung („Altersver-

*ginella*-Arten. Ich werde beide Arbeiten an den geeigneten Stellen dieser Mitteilung in Anmerkungen berücksichtigen.

<sup>1)</sup> Ich habe ferner nachträglich Chromoplasten in vegetativen Organen auch bei mehreren Pflanzen gefunden, welche in Mittel- und Nordeuropa wild wachsen oder im Freien kultiviert werden; die Untersuchungen darüber sind aber noch nicht abgeschlossen und sollen später mitgeteilt werden. Die vorliegende Arbeit behandelt nur Pflanzen, die aus den Tropen oder wenigstens aus der wärmeren Region der gemäßigten Zone stammen.



gildung“) vegetativer Organe, sowie alles, was im Verdacht stand, in diese Kategorie zu gehören, 4) die Moose und niederen Kryptogamen, obwohl sich unter ihnen ebenfalls Objekte mit Chromoplasten in vegetativen Organen finden dürften, z. B. die roten Chroolepidaceen.

Die Arbeit gliedert sich in einen Allgemeinen Teil, welcher eine zusammenfassende Darstellung meiner Beobachtungen bringt, und einen Speziellen Teil, in welchem die untersuchten Objekte in systematischer Reihenfolge beschrieben werden. In Anbetracht der außerordentlichen Mannigfaltigkeit der Verhältnisse im einzelnen, sowie des Umstandes, daß viele meiner Objekte schwer zugänglich sind und kaum je wieder unter das Mikroskop kommen dürften, hielt ich es für angezeigt, die Mehrzahl derselben einzeln zu beschreiben, die flüchtiger untersuchten oder nichts Besonderes bietenden möglichst kurz, manche aber ziemlich eingehend; nur wo ich aus einer Gattung oder einer Familie zahlreiche Objekte untersuchte, beschreibe ich nur eine Auswahl derselben. Diese dokumentarische Festlegung der beobachteten Tatsachen, welche dem Allgemeinen Teil zugrunde liegen, wie etwa die Tabellen in physiologischen Arbeiten, ist nicht dazu bestimmt, von A bis Z gelesen zu werden; dem Leser, den die Sache nicht gerade ganz speziell interessiert, empfehle ich, seine Aufmerksamkeit nur einer Auswahl von denjenigen Objekten, welche ausführlicher beschrieben sind, zu widmen, etwa einigen von den folgenden (in Klammern stehen die Nummern des Speziellen Teiles): *Botrychium* (1), *Marsilia spec.* (2), *Selaginella laevigata* und *fimbriata* (7, 8), *Encephalartos* (15), *Gnetum funiculare* (24), *Bambusa nana* (30), *Cocos* (32) oder eine andere Palme, *Lycaste* (50), *Grammatophyllum* (55), *Vanilla Walke-riæ* (60), *Rhynchosstylis* (62), *Ficus* (68), *Viscum* (69), *Cassytha* (74), *Brexia serrata* (76), *Xanthophyllum* (85), *Croton* (86), *Gonocaryum* (88), *Fagraea litoralis* und *monantha* (91, 92), *Heligme* (95), *Dischidia Rafflesiana* und *Gaudichaudii* (97, 98), *Hoya lacunosa* (99). Diese Auswahl ist so getroffen, daß sie eine gute Vorstellung von den bestehenden Verhältnissen und ihrer großen Mannigfaltigkeit gibt.

Ich bedauere lebhaft, diese Arbeit nicht durch farbige Zeichnungen illustrieren zu können. Die Struktur der Chromoplasten ist freilich so einfach, daß sie auch ohne Abbildungen verständlich ist, und allenfalls genügt eine Verweisung auf Schimper's Figuren von Chromoplasten mit amorphen Farbstoffeinschlüssen (Taf. III,



Fig. 24—27, 42), welche, bis auf die z. T. kompliziertere Gestalt, manchen der von mir zu besprechenden Chromoplasten ganz ähnlich sind. Wichtiger wäre es gewesen, die Verteilung der Chromoplasten im Querschnitt einiger Objekte darzustellen, und gerne hätte ich auch einige meiner charakteristischen Objekte in natürlicher Größe und Farbe reproduziert. Doch konnte ich mich bei der beschränkten Zeit in Buitenzorg unmöglich mit der Anfertigung umständlicher mikroskopischer Zeichnungen aufhalten, das Malen aber ist nicht jedermanns Sache, und es gab leider zu meiner Zeit im Buitenzorger Garten niemanden, der dazu berufen wäre.

Ich muß hier noch vorgreifend erwähnen, daß die Chromoplasten auch Chlorophyll enthalten können. „Reine“ Chromoplasten führen Tröpfchen („Grana“) in einem völlig farblosen plasmatischen Stroma; oft erweist sich aber das Stroma bei genauer Untersuchung als blaßgrünlich gefärbt, und nicht selten ist es auch ganz deutlich grün, so daß die Plastiden die Charaktere von Chromoplasten und Chloroplasten gleichzeitig aufweisen oder selbst sich mehr den letzteren nähern. Solche Mischgebilde werde ich im Gegensatz zu den eigentlichen Chromoplasten als Intermediärplastiden bezeichnen. Sie kommen häufig in denselben Organen neben eigentlichen Chromoplasten vor, oft aber auch allein, und es werden Fälle der letzteren Art in der vorliegenden Arbeit ebenfalls berücksichtigt. Der Kürze halber werde ich vielfach, wo es auf die Unterscheidung nicht ankommt, unter dem Namen Chromoplasten (im weiteren Sinn) die eigentlichen Chromoplasten und diese Intermediärplastiden zusammenfassen, also alle Plastiden, welche farbige (nicht grüne) Grana enthalten; und zwar werde ich darunter, wo nicht das Gegenteil gesagt ist, immer nur „vegetative“ Chromoplasten verstehen.

## ALLGEMEINER TEIL.

### I. Verbreitung im System.

Die 42 Familien, denen die untersuchten Pflanzen angehören, verteilen sich ziemlich gleichmäßig auf alle Klassen der Gefäßpflanzen. Von den größeren natürlichen Gruppen habe ich nur bei den eigentlichen Farnen vergeblich nach Chromoplasten gesucht. Unter den Dikotylen kommen sie wohl relativ seltener vor als unter den Gefäßkryptogamen, Gymnospermen und Monokotylen,



sind aber immerhin bei zirka 40 Arten aus 25 Familien konstatiert worden.

Es gibt einige größere Familien (*Orchidaceae*, *Palmae*) und Unterfamilien (*Bambuseae*), in denen „vegetative“ Chromoplasten verhältnismäßig häufig sind, und ebenso einige größere Gattungen (*Selaginella*, *Macrozamia*, *Gnetum*, *Vanilla*, *Gonocaryum*, *Fagraea*), wo dieselben bei vielen oder gar der Mehrzahl der Spezies vorkommen (jedoch wohl nie bei allen Spezies, vielleicht mit Ausnahme von *Gnetum*). In der Regel findet man aber Chromoplasten nur bei einzelnen Gattungen innerhalb der Familie und bei einzelnen Spezies innerhalb der Gattung; so sind beispielsweise *Freyinetia spec.* (28)<sup>1)</sup>, *Smilax oxyphylla* (42), *Ficus diversifolia* (68), *Hippocratea indica* (87) u. a. die einzigen unter vielen beobachteten Arten ihrer Gattung (und meist auch der Familie), bei denen ich Chromoplasten angetroffen habe. Die Verbreitung im System hat also einen sporadischen und sozusagen zufälligen Charakter.

Aber auch bei den Arten, wo ich Chromoplasten gefunden habe, braucht ihre Anwesenheit keineswegs konstant zu sein. Von einigen Pflanzen gibt es verschiedene Varietäten oder Rassen: „bunte“ mit Chromoplasten in gewissen Organen und „grüne“, bei denen sich an deren Stelle Chloroplasten befinden<sup>2)</sup>. Sicher ist das bei *Cocos* (32), von der es Varietäten mit gelben Blattstielen (und zugleich gelbbraunen Früchten) und solche mit grünen Blattstielen (und Früchten) gibt. Dasselbe scheint bei der viel kultivierten *Bambusa vulgaris* der Fall zu sein, welche man bald mit gelben, bald mit gelb und grün gestreiften, bald mit ganz grünen Stämmen und Zweigen antrifft. Ich vermute, daß es auch von *Cassytha* (74) eine gelbstengelige und eine grünstengelige Varietät gibt. Um noch ein Beispiel anzuführen, werden von *Selaginella spec.* aus Deli (9) im

<sup>1)</sup> Die eingeklammerten Zahlen verweisen hier und im folgenden auf die Nummer, unter der die betr. Pflanze im Speziellen Teil beschrieben ist; wenn keine Zahl angegeben ist, so bedeutet das, daß die betr. Pflanze im Speziellen Teil nicht besprochen ist. Wo eine Gattung im Speziellen Teil nur durch eine Art vertreten ist, werde ich im folgenden der Kürze halber nur den Gattungsnamen nennen.

<sup>2)</sup> Solche Fälle lassen sich mit den durch Anthocyan rotfarbigen Varietäten von für gewöhnlich grünen Pflanzen (Blutbuche u. a.) vergleichen; wie denn überhaupt die Chromoplasten in Bezug auf ihre Verbreitung und die Bedingungen ihres Auftretens viel Analogie mit den Zellsaftpigmenten, insbesondere mit dem roten Anthocyan aufweisen und mit ihnen gewissermaßen vikariieren.



Buitenzorger Garten nebeneinander zwei sonst ganz gleiche Formen kultiviert, von denen die eine braunes, die andere rein grünes Laub hat.

Sehr häufig sind die Fälle, wo ein Objekt nur in der Jugend, oder umgekehrt nur im erwachsenen Zustand oder sogar erst in einem gewissen Alter Chromoplasten führt; dieser Einfluß des Entwicklungsstadiums wird in Kapitel VI näher besprochen, so daß sich hier die Anführung von Beispielen erübrigt. Dagegen seien hier noch Fälle erwähnt, wo nicht das Entwicklungsstadium des betr. Organs, sondern dasjenige des ganzen Individuums ausschlaggebend ist. Bei manchen Palmen sind verschiedene Teile des Blattes, insbesondere der Blattstiel, durch Chromoplasten gelb oder orange gefärbt, aber nur bei noch ziemlich jungen Exemplaren, während bei alten Pflanzen, die schon einen freien Stamm haben, das nicht mehr der Fall ist. Ein Pendant hierzu, aber in umgekehrtem Sinne, finden wir bei *Trichosanthes* (103), bei dem die Blattstiele in allgemeinen gelb, an den abweichend geformten Jugendblättern aber grün sind. Vielleicht gehört hierher auch *Alsomitra* (104), wo bei dem Exemplar im Buitenzorger Lianenquartier die Blatt- und Blättchenstiele und z. T. auch die Internodien an den Klettersprossen gelb, an den niederliegenden Sprossen hingegen (deren Blätter etwas abweichend gestaltet sind) grün sind, während bei einem großen, hochkletternden Exemplar in der *Canarium*-Allee alles grün ist.

Andererseits ist nicht selten die Ausbildung von Chromoplasten an eine hinreichend intensive Beleuchtung gebunden, so daß an beschatteten Exemplaren die Chromoplasten ganz fehlen und durch Chloroplasten vertreten sein können (meist handelt es sich freilich nur um quantitative Unterschiede). Dieser Lichteinfluß wird ebenfalls weiter unten noch erörtert werden.

Endlich kommen auch rein individuelle, von Alter und äußeren Bedingungen allem Anschein nach unabhängige Verschiedenheiten vor. So fand ich bei einem Exemplar von *Ficus diversifolia* im Walde von Tjibodas (68, A) alle Blätter unterseits durch Chromoplasten gelb gefärbt; bei einem zweiten, nur wenige km davon entfernt wachsenden Exemplar (68, B) war das nur bei gewissen Blättern und meist in geringerem Grade der Fall; bei zahlreichen Exemplaren endlich, die ich an anderen Orten in West-Java fand, war die Gelbfärbung der Blätter gar nicht oder nur andeutungsweise



vorhanden. *Psilotum triquetrum* ist in der Regel rein grün; aber das sub Nr. 6 beschriebene Exemplar hatte einen durch Chromoplasten gelblichen Stengel mit gelben Schuppenblättern. Bei *Dischidia albida* (96), an verschiedenen Stellen im Buitenzorger Garten zerstreut, ist je nach dem Exemplar der Stengel bald grauweiß (mit blassen Chloroplasten, deren Farbe durch einen Wachsüberzug maskiert wird), bald weißlichgelb mit gelben Chromoplasten.

In Anbetracht dieser vielseitigen Variabilität fragt es sich, ob es denn überhaupt Pflanzen gibt, bei denen die Anwesenheit von Chromoplasten in bestimmten vegetativen Organen eine konstante, für die Spezies charakteristische Erscheinung ist. Ich kann das freilich nicht mit voller Sicherheit behaupten, da ich nur wenige meiner Objekte in mehreren bis vielen Exemplaren und keines an genügend zahlreichen Orten zu sehen Gelegenheit hatte; ich halte es aber für sehr wahrscheinlich, daß obige Frage für viele Objekte zu bejahen ist. So sah ich z. B. *Cassia alata* (80) wiederholt wildwachsend auf Sumatra und Ceylon, und dann noch in Peradeniya kultiviert; überall hatte sie dieselbe gelbbraune Farbe der Blattgelenke usw. *Gonocaryum fuscum* (88), in mehreren Exemplaren verschiedenen Alters über den Buitenzorger Garten zerstreut und auch in Peradeniya gesehen, fiel überall durch seine leuchtend orangen Blattstiele auf. *Selaginella laevigata* (7) hatte sowohl im Urwalde bei Buitenzorg wie im Gewächshaus in Kew rote Stengel und stellenweise rote Blätter.

Was die Verteilung der Chromoplasten auf die biologischen Gruppen betrifft, so befinden sich unter meinen Objekten nur vier chlorophyllfreie Saprophyten (65—67, sämtlich Orchideen); alle übrigen sind „grüne“ Pflanzen, und zwar zwei Parasiten (*Viscum*, 69, und *Cassytha*, 74), zahlreiche Epiphyten und Lianen, einige Wasserpflanzen (*Marsilia*-Arten, 2—4), Sukkulente (*Aloineae*, 43—47, *Alsomitra*, 104), vorwiegend aber gewöhnliche, mesophytische und hygrophytische Bäume, Sträucher und Kräuter. — Was die geographische Herkunft anbetrifft, so stammen die untersuchten Pflanzen aus den wärmeren Ländern aller Erdteile, mit Ausnahme von Europa, welches nur bedingt durch *Marsilia quadrifolia* vertreten ist.

## II. Verbreitung in den Organen.

Der Fall, daß die ganze Pflanze, wenigstens in ihren oberirdischen Teilen, Chromoplasten enthält, ist begreiflicherweise selten.



Außer den chlorophyllfreien Saprophyten (65—67) und der gelben Form von *Cassytha* (74, hier mit Einschluß der Haustorien) sind nur die stärker gefärbten Exemplare resp. Formen einiger *Selaginella*-Arten zu nennen (8, 9), welche übrigens nicht ganz chlorophyllfrei sind. Bei allen übrigen Objekten sind es nur bestimmte Organe oder Teile von Organen, in denen sich Chromoplasten finden; diese Teile sind aber in den einzelnen Fällen außerordentlich verschieden, und man kann sagen, daß es keinen vegetativen Organteil gibt, welcher nicht Chromoplasten führen kann, sei es ausschließlich oder doch vorwiegend, dauernd oder vorübergehend. Nur in Bodenwurzeln, unterirdischen Knollen und Zwiebeln habe ich nicht nach Chromoplasten gesucht, obwohl der bekannte Fall von *Daucus Carota* lehrt, daß auch hier ihr Vorkommen möglich ist.

Im folgenden lasse ich die Organe, in denen ich Chromoplasten (im weiteren Sinne) beobachtet habe, Revue passieren, unter Anführung ausgewählter Beispiele; das Zeichen \* bedeutet, daß bei der betr. Pflanze Chromoplasten nur in dem genannten Organ gefunden wurden.

#### A. Wurzeln.

Im Humus verborgene Wurzeln von Epiphyten: *Lycopodium* (5); \**Hoya lacunosa* (99).

Luftwurzeln: viele epiphytische Orchideen, z. B. *Liparis* (51), \**Coelogyne Rochussenii* (55), \**Rhynchostylis* (62); *Dischidia Gaudichaudii* (98); \**Hoya obovata* (100).

Haustorien: *Cassytha* (74).

Wurzelträger der meisten *Selaginella*-Arten; bei einer unbenannten, im Speziellen Teil nicht besprochenen Art \*.

#### B. Stengelorgane.

Unterirdisches Rhizom: *Selaginella amoena* (12).

Oberirdisch kriechende Stengel und Ausläufer: *Selaginella spec.* (13); *Dischidia Gaudichaudii* (98); mehrere Orchideen, z. B. *Coelogyne mimata* (53).

Blattlose Stengel von Parasiten: \**Viscum* (69); *Cassytha* (74).

Stengelknollen: viele epiphytische Orchideen, z. B. \**Pholidota articulata* (56), *Miltonia* (57).

Krautige Stengel: *Selaginella*-Arten, z. B. *S. laevigata* (7); *Lycopodium* (5), \**Croton* (86); \**Dischidia albida* (96).

Monokotylen-Stämme und -Zweige: *Bambusa*-Arten, z. B. *B. nana* (30); *Calamus*-Arten; \**Pothos* (39); \**Smilax* (42).

Jüngere (1—2-jährige) Triebe holziger Gymnospermen und Dikotylen: *Araucaria* (21); *Gnetum funiculare* (24); *Olax* (70); *Gonocaryum fuscum* (88); im jungen Zustande auch viele andere.



## C. Blattorgane.

Lamina der Laubblätter in ganzer Ausdehnung (aber an ausgewachsenen Blättern meist nicht in der ganzen Dicke): *Lycopodium* (5); viele *Selaginella*-Arten, besonders die braune Varietät von *S. spec.* (9); \**Haworthia*-Arten (43); *Lycaste* (50); *Vanda* (61); \**Ficus* (68); *Olax* (70). Nur in der Jugend noch bei manchen anderen, z. B. \**Encephalartos* (15), *Gnetum*-Arten (24–27), *Freycinetia* (28), *Hippocratea* (87).

Rand der Lamina: *Marsilia spec.* (2); mehrere Palmen, z. B. *Stevensonia* (33); *Hyophorbe*-Arten; *Cassia alata* (80); *Fagraea litoralis* (91). Häufig ist ein schmaler Randstreif zwar nicht ausschließlich, aber stärker als die übrige Lamina gefärbt. Auch die Basis oder die Spitze der Lamina zeichnet sich manchmal durch bevorzugte oder alleinige Färbung aus, z. B. *Selaginella*-Arten (7 e z. T.), *Millettia* (57).

Die Mittelrippe resp. die Hauptnerven der Lamina recht häufig, z. B. *Stevensonia* (33), *Coelogyne miniata* (53), \**Pseudopanax* (90).

Metamorphosierte Blattspreiten: die zu Haken umgebildeten basalen Fiedern von *Desmoncus* (37); die Kannen von *Dischidia Rafflesiana* (97).

Blattstiel resp. Rhachis sehr häufig, z. B. *Botrychium* (1); *Agathis* (19); *Gnetum*-Arten (24–27, hier an erwachsenen Blättern öfter \*); *Bambusa nana* (30); fast alle untersuchten Palmen, u. a. *Cocos* (32), \**Latania Commersonii*; *Vanilla africana* (59); *Landolphia* (94); \**Citharexylon* (101), nur im Basalteil.

Gelenke der Blätter und Blättchen: *Marsilia*-Arten (2–4); \**Actoplanes* (49); *Disciphania* (71); \**Cassia obovata* (81); *Guajacum* (83).

Schwellpolster der Fiedern: \**Macrozamia*-Arten (17); \**Stangeria* (18); alle untersuchten Fiederpalmen, z. B. *Cocos* (32).

Stacheln und die dieselben tragenden Schwielen am Blattstiel, Rhachis und Flagellum bei den Kletterpalmen: *Calamus*-Arten, *Daemonorope* (38), *Desmoncus* (37).

Blattscheide: *Bambuseae*, z. B. *Gigantochloa* (31); Palmen, z. B. *Raphia vinifera*; \**Gasteria nigricans* (45); \**Grammatophyllum* (55).

Nebenblätter: *Fagraea litoralis* (91).

Niederblätter: *Psilotum* (6); *Selaginella amoena* (12), hier am unterirdischen Rhizom; *Gnetum funiculare* (24); *Bambusa nana* (30); *Pholidota imbricata* (58); *Cassytha* (74); *Fagraea monantha* (92).

Die Verbreitung der Chromoplasten innerhalb des Individuums ist spezifisch außerordentlich verschieden. Sie kann eine ganze Reihe von verschiedenen Organen umfassen, oder sich nur auf wenige Organe erstrecken, oder endlich sich nur auf ein bestimmtes Organ oder gar einen bestimmten Teil eines Organs beschränken. Für den letzteren Fall bieten die mit \* bezeichneten Objekte des obigen Verzeichnisses eine Reihe von Beispielen, denen ich hier noch die folgenden Fälle von ganz speziell lokalisiertem Vorkommen anreihe:



*Flagellaria* (41): nur die Rankenspitze des Blattes; *Zamioculcas* (40): nur die Blattachseln und die nächstangrenzende Partie der Oberseite der Blattstiele und des Stengels; *Acacia* (79): nur die gelenkartige Basis der Phyllodien—oberseits; *Passiflora* (89): nur kleine Höcker auf der Blattoberseite über den Nektarien.

Als Beispiele sehr ausgedehnter Verbreitung der Chromoplasten seien hingegen genannt:

*Coelogyne miniata* (58): der kriechende Stamm, die Knollen, Niederblätter, Blattstiele, Blattnerven, Luftwurzeln.

*Fagraea monantha* (92): Zweige, Niederblätter, Nebenblätter, Unterseite der Lamina und die Umgebung der Nektarien in der Lamina.

Wie sehr diese Verhältnisse selbst bei Arten einer Gattung variieren können, zeigt die Gegenüberstellung der am Eingang des Kapitels erwähnten *Selaginella*-Arten (8, 9), welche in allen oberirdischen Organen Chromoplasten führen, mit der in der Übersicht schon berücksichtigten *Selaginella spec.*, bei welcher nur die Wurzelträger blaßrötlich sind. Als Beispiele von weniger extremen, aber z. T. doch recht weitgehenden spezifischen Differenzen seien noch genannt: die Arten von *Marsilia* (2—4), *Gnetum* (24—27), *Brexia* (76—78), *Cassia* (80, 81), *Fagraea* (91—93).

Daß die individuellen Differenzen von starker Chromoplastenfärbung bestimmter Organe bis zu völligem Mangel derselben gehen können, wurde bereits im vorigen Kapitel erwähnt. Hier, wo es sich um quantitative Differenzen in der Ausbreitung der Chromoplasten handelt, sei noch auf *Viscum* (69) aufmerksam gemacht, bei dem sich mehrere, auf einem und demselben Baum nebeneinander wachsende Exemplare recht verschieden verhielten: bei Exemplar *A* waren alle Internodien mit Ausnahme der basalen mehr oder weniger gelb, bei *B* nur stellenweise die obersten gelblich, bei *C* die oberen rein gelb und überdies ein Querring an der Grenze je zweier Internodien orange gefärbt.

Daß auch innerhalb eines Individuums bedeutende lokale Differenzen auftreten können, zeigt u. a. *Lycopodium* (5), wo die Blätter an gewissen Zweigen blaßgrün, an anderen oberseits gelb sind. Während in diesem Fall die Verschiedenheit gewissermaßen zufällig zu sein scheint, hängt sie bei anderen Objekten mit dem morphologischen Ort der Organe zusammen, und zwar in spezifisch verschiedener Weise. Während bei *Viscum* (69, *A*) die unteren Internodien grün, die übrigen in akropetal zunehmendem Grade gelb sind, sehen wir bei *Croton* (86) die rote Färbung der Internodien



aufwärts abnehmen und in den Endzweigen ganz schwinden. Bei *Brexia serrata* (76) sind an den aufrechten, aus der Stammbasis entspringenden Trieben (A) die Internodien und Blätter in großer Ausdehnung braun resp. rot gefärbt, während an den Zweigen der Baumkrone (C) die Färbung sich auf die Blattstiele beschränkt. Bei derselben Art sowie bei *Brexia americana* (77) fällt es ferner auf, daß die Blattstiele der morphologisch oberen Blätter der Kronentriebe allein oder doch stärker gefärbt sind als die der übrigen Blätter desselben Triebes. Dieselbe Bevorzugung der Stiele der morphologisch obersten Blätter der Triebe findet sich oft bei den *Gnetum*-Arten. Gerade umgekehrt verhält es sich bei *Dammara spec.* (20), wo die Stiele der basalen Blätter des Jahrestriebes stärker und in größerer Ausdehnung gerötet sind, als die der übrigen Blätter desselben Triebes.

---

Häufig sind die chromoplastenführenden Organe sehr auffallend, manchmal geradezu leuchtend gefärbt, meist in verschiedenen Tönen von gelb oder orange, seltener rot<sup>1)</sup>, noch seltener gelbbraun. Als Beispiele sehr intensiver und reiner Färbungen seien genannt: die Schwellpolster der Fiedern einiger *Macrozamia*-Arten (17), die gefärbten Blattpartien von *Stevensonia* (33), der Blattstielfortsatz und das Zentrum der Lamina von *Thrinax* (34, b), die Gelenke der *Cassia*-Arten (80, 81), der Blattstiel von *Gonocaryum* (88). In vielen anderen Fällen, wo die Chromoplasten weniger dominieren und ihre Farbe sich mit viel Grün kombiniert (worüber näheres in Kap. III und IV), kommen weniger auffallende Mischfärbungen zustande: grünlichgelb bis gelbgrün, braun in verschiedenen Tönen

<sup>1)</sup> Die in den Tropen sehr häufige rote Färbung verschiedener vegetativer Organe rührt in den weitaus meisten Fällen von rotem Zellsaft her, viel seltener von Chromoplasten. Bei einiger Erfahrung erkennt man schon an dem Ton der roten Farbe mit großer Wahrscheinlichkeit, welche von diesen beiden Färbungsursachen vorliegt: die purpurnen und die sich diesen nähernden Farbtöne sind nie durch Chromoplasten bedingt, während ziegelrote, mennigrote, fleischrote, braunrote Farben in der Regel von diesen herrühren, ebenso wie die gelben und orangen Färbungen. Auch diese Färbungen sind aber zuweilen nicht durch Chromoplasten, sondern durch andere Ursachen bedingt, unter denen gefärbte Membranen an erster Stelle zu nennen sind; solche Fälle sollen in den Anmerkungen des speziellen Teils erwähnt werden, soweit sie Pflanzen aus denselben Familien betreffen.



bis rotbraun. Manchmal ist nur ein leichter gelblicher, bräunlicher oder rötlicher Anflug vorhanden, der nur dem geübten Auge die Anwesenheit von Chromoplasten verrät; so z. B. in der Knolle von *Pholidota articulata* (56), den jüngeren Internodien von *Vanilla Walkeriae* (60, a), in den Blattstielen von *Roydsia* (75). Außer einem überwiegenden Chlorophyllgehalt können noch verschiedene andere Ursachen die äußere Färbung des Organs beeinflussen, indem sie die von den Chromoplasten herrührende Farbe abschwächen oder modifizieren; so z. B. Wachsüberzüge (*Encephalartos*, 15, a), Kristalle in den peripherischen Zellschichten (*Disciphania*, 71), Zellsaftpigmente (*Didymoplexis*, 66), gefärbte Membranen; unter Umständen tritt die Chromoplastenfarbe an Schnitten deutlicher und reiner hervor als am ganzen Organ. Manchmal kommt es zu einer vollständigen Maskierung der Chromoplastenfarbe durch einige der genannten Ursachen (bei Orchideen-Luftwurzeln oft auch durch das lufthaltige Velamen), am häufigsten durch roten Zellsaft, welcher oft nicht nur in denselben Organen, sondern auch in denselben Zellen mit Chromoplasten vorkommt und bei hinreichender Konzentration allein die äußere Färbung des Organs bestimmt, z. B. im Blattstiel von *Verschaffeltia* (36), in den schön gefärbten Blattscheiden der Zierpalme *Cyrtostachys Lakka*, in der Luftwurzel von *Vanda* (61).

Endlich kommt es auch vor, daß Chromoplasten zwar vorhanden sind, aber so zerstreut und klein, daß sie die Farbe des Organs nicht merklich beeinflussen; dieses erscheint daher makroskopisch farblos, wie die jungen Stengelteile von *Lycopodium* (5, b) und die Innenseite der Blattscheide von *Grammatophyllum* (55), oder rein grün, wie die meisten Organe von *Fagraea litoralis* (91) und die grünen Internodien von *Viscum* (69, B). Solche Fälle, ebenso wie diejenigen vollständiger Maskierung der Chromoplastenfarbe, können gewissermaßen nur zufällig entdeckt werden, und mögen viel häufiger sein, als ich sie beobachtet habe.

### III. Verteilung auf die Gewebe.

Chromoplasten können in allen lebenden Zellen vorkommen, selbst die engen Elemente der Leitstränge und die dickwandigen Sklerenchymfasern nicht ausgenommen (obwohl sie in diesen spärlich und sehr winzig zu sein pflegen und daher leicht zu über-



sehen sind); und ich habe in der Tat bei manchen Objekten ihre Anwesenheit in der ganzen Masse des Organs und in seinen sämtlichen lebenden Geweben konstatiert, z. B. im Stengel von *Lycopodium* (5), in allen Organen von *Selaginella fimbriata* (8), im Blattstiel von *Cocos* (32), im Stengel von *Cassytha* (74). Bei solchen Objekten fehlen also sowohl Chloroplasten wie Leukoplasten gänzlich. Es gibt ferner Fälle, wo Chromoplasten zwar in den meisten Geweben vorhanden sind, aber doch mit gewissen Ausnahmen; so finden sich z. B. im Blattstiel von *Gonocaryum fuscum* (88) Chromoplasten überall mit Ausnahme des Holzkörpers, dessen Parenchym kleine Chloroplasten enthält. Wohl bei den meisten Objekten beschränkt sich aber die Anwesenheit der Chromoplasten nur auf bestimmte Gewebe, vor allem auf das Grundparenchym oder nur auf bestimmte Parteien desselben, während die übrigen Gewebe resp. Parteien Chloroplasten oder Leukoplasten enthalten.

Unabhängig davon, welche von den obigen Möglichkeiten zutrifft, können nun weiter die Chromoplasten in verschiedenen Parteien des Organquerschnitts sehr ungleich ausgebildet sein in Bezug auf ihre relative Menge, Größe, Intensität der Färbung und Reinheit (letzteres in Abhängigkeit von der Ab- oder Anwesenheit und der Menge von Chlorophyll im Stroma), so daß man gewöhnlich einen Ort der sozusagen maximalen Entwicklung der Chromoplasten im Querschnitt des Organs feststellen kann; es können aber auch mehrere solche Maxima vorhanden sein. In Bezug auf die Lage dieser Maxima, deren Intensität und den Grad der vorhandenen Differenzen u. s. w. herrscht nun wieder eine außerordentliche Mannigfaltigkeit je nach der Spezies und dem Organ, so daß sich darüber kaum etwas Allgemeines aussagen läßt.

In der Regel liegt das Maximum in den peripherischen Zellschichten des Parenchyms (von der Epidermis vorläufig abgesehen), oft deutlich in der subepidermalen Zellschicht; von hier aus nach innen nehmen die Chromoplasten mehr oder weniger rapid ab und sind in einem mehr oder weniger ausgedehnten inneren Gewebekomplex sehr viel schwächer entwickelt oder auch ganz abwesend. Das ist oft schon makroskopisch sichtbar in Form eines schmalen, intensiv gefärbten Streifens an der Peripherie des Querschnitts. Manchmal beschränken sich die Chromoplasten nur auf wenige peripherische Zellschichten, so daß, wenn man einen Flächenschnitt abträgt, dieser gefärbt erscheint, das bloßgelegte Gewebe aber



farblos resp. grün. An flächenförmigen Blattorganen finden sich die Chromoplasten oft nur an der Unterseite, sei es nun im ganzen Schwammparenchym, wie bei *Ficus* (68, A), oder häufiger nur in wenigen peripherischen Schichten, wie bei *Fagraea monantha* (92); doch können sich auch beide Blattseiten gleich verhalten, wie bei *Pholidota imbricata* (58), oder die Oberseite bevorzugt sein, wie bei erwachsenen Blättern von *Lycaste* (50, b).

Nicht selten kommt es jedoch auch vor, daß das Chromoplasten-Maximum nicht in der peripherischen, sondern in einer mittleren Zone oder selbst im zentralen Teil des Organs liegt. So enthalten im Blattstiel von *Gnetum Gnemon* (27), in Stamm und Luftwurzel von *Freycinetia* (28) die mittleren, im Blattstiel von *Cocos* (32) die mittleren und inneren Rindenschichten die größten und zahlreichsten Chromoplasten. Bei *Gnetum funiculare* (24) finden sich in jungen Internodien und Blattstielen braunrote Plastiden einerseits in den peripherischen Schichten der Rinde, andererseits im zentralen Teil (Mark resp. Xylemparenchym), während in der inneren Rinde die Plastiden grün sind. An der Oberseite des Blattstiels von *Gnetum spec.* (25) liegt das Chromoplasten-Maximum in der mittleren Rinde, die innere führt Chloroplasten, dagegen treten in der Stärkescheide wieder rote Chromoplasten auf. Im Stengel von *Selaginella fimbriata* (8) sind Chromoplasten zwar überall vorhanden, aber nur im Parenchym der Stele und den innersten Schichten der Rinde sind sie groß und zahlreich, so daß makroskopisch nur das Zentrum des Querschnitts deutlich rot erscheint. In der Lamina von *Brezia serrata* (76, A a) finden sich die roten Chromoplasten nur in den inneren Mesophyllschichten.

Oft macht sich eine deutliche Beziehung der Chromoplasten zu den Leitsträngen bemerkbar, indem diese von einer Scheide aus einer oder mehr Zellschichten umgeben sind, deren Zellen reicher an Chromoplasten sind als das umliegende Gewebe. Aus diesem Grunde treten z. B. im peripherischen Teil der Knolle von *Coelogyne miniata* (58) die Leitstränge am Querschnitt schon makroskopisch als tief rote Punkte auf blaßbrötlichem Grunde hervor; im jüngeren Laubblatt derselben Pflanze sind die Strangscheidensogar der einzige Ort, wo sich Chromoplasten finden. Im Blatt von *Ficus* (68, A) scheint es auf den ersten Blick umgekehrt zu sein, indem unterseits die Nerven auf gelbem Grunde farblos erscheinen; in Wirklichkeit sind auch hier die Stränge von



einer chromoplastenführenden Scheide umgeben, und die Nerven erscheinen nur darum äußerlich farblos, weil diese Scheide von der unterseitigen Epidermis durch farblose Zellen mit großen Kristallen getrennt ist, welche die gelbe Farbe nicht durchscheinen lassen. Im Blat von *Ola* (70, c) haben die im grünen Mesophyll eingebetteten Stränge zwar keine solchen Scheiden, führen aber Chromoplasten im Strangparenchym selbst und in den Sklerenchymfasern.

Es fehlt aber auch nicht an Fällen gerade umgekehrter Art. So ist in den Blattgelenken von *Disciphania* (71) die nächste Umgebung der einzelnen Stränge der einzige Ort (außer der Epidermis), wo sich reine Chloroplasten befinden. Einen merkwürdigen Fall individueller Variation finden wir bei *Selaginella laevigata* (7): während in dem äußerlich grünen Stengel des einen Exemplars (B) nur die Umgebung der Stränge rotbraune Chromoplasten enthält, ist es in dem roten Stengel des gleichzeitig gesammelten Exemplars A eben diese Gewebepartie, welche allein Chloroplasten führt.

Als schönes Beispiel spezifisch ungleichen Verhaltens sei noch angeführt, daß bei *Selaginella proniiflora* (10) das sog. Trabekulargewebe in der die Stele umgebenden Lakune die am stärksten rotgefärbten Chromoplasten im Stengel enthält, während im Stengel von *Sel. spec.* (11) dies die einzige Stelle ist, welche nicht Chromoplasten, sondern Chloroplasten führt, und bei *Sel. spec.* (13) am gleichen Ort sich Leukoplasten finden.

Die Epidermis ist bei ziemlich vielen Objekten frei von Chromoplasten, selbst wenn das Maximum dieser sich in der subepidermalen Schicht befindet. Als Beispiele seien genannt die Blätter von *Gasteria cheilophylla* (44) und *Pholidota imbricata* (58), die Blattmittelrippe von *Panax* (90), die Gelenke von *Disciphania* (71) und *Cassia alata* (80), die Stengel und Wurzeln von *Dischidia Gaudichaudii* (98). Häufiger aber kommt es vor, daß auch die Epidermis Chromoplasten führt; so bei *Lycopodium* (5), den *Selaginella*-Arten (7 ff.), *Gasteria nigricans* (45), den Knollen von *Pholidota articulata* (56), bei *Fragaria monantha* (92), und vielen anderen. Man beachte die aufgeführten Fälle verschiedenen Verhaltens von Arten derselben Gattung. Die saprophytische Orchidee *Galeola* (65) ist das einzige Objekt, wo ich die Chromoplasten auch in Haaren gefunden habe. *Bambusa spec.* (29) ist dadurch bemerkenswert, daß die Chromoplasten in den Langzellen und den Kurzzellen der Epi-



dermis sich in Farbe, Zahl und Anordnung verschieden verhalten; ja an der Schattenseite der Zweige finden sie sich nur in den Kurzzellen, und dieses Verhalten wurde an den Zweigen von *Bambusa nana* (30) überall beobachtet. Hieran seien die recht verbreiteten sonstigen Fälle angeschlossen, wo das Verhalten lokal verschieden ist. Im Blattstiel von *Trichosanthes* (103) führen die Epidermiszellen teils Chromoplasten, teils Leukoplasten, teils Übergangsgebilde zwischen beiden mit blassen Granis. Während bei diesem Objekt die Anordnung der Zellen mit verschiedenen Plastiden anscheinend regellos ist, treten bei *Zamioculcas* (40) Chromoplasten in der Epidermis nur an der Stelle der maximalen Färbung auf, nämlich in der Blattachsel; in den schwächer gefärbten, angrenzenden Partien hingegen führt die Epidermis Leukoplasten. In einer ganzen Reihe anderer Fälle variiert das Verhalten je nach dem Organ. Bei *Botrychium* (1) sind Epidermis-Chromoplasten im Blattstiel vorhanden, in der Rhachis nicht; bei *Gnetum funiculare* (24) sind sie in den Internodien vorhanden, im Blattstiel und der jungen Lamina nicht; bei *Verschaffeltia* (36) im Blattrand vorhanden, im Blattstiel nicht; bei *Fagraea litoralis* (91) in den Stipeln vorhanden, in Internodien und Blattstielen nicht.

Wo Chromoplasten in der Epidermis vorhanden sind, pflegen sie meist viel kleiner und auch weniger zahlreich zu sein als in dem angrenzenden Parenchym. Doch fehlt es nicht an Objekten, wo sie hier ebenso zahlreich und groß sind wie dort, z. B. bei einer unbestimmten Bignoniacee (102); manchmal befindet sich sogar das Maximum in der Epidermis, so in den Knollen von *Pholidota articulata* (56) und bei *Olearia* (105). Endlich gibt es Objekte, bei denen die Epidermis der alleinige Sitz von Chromoplasten ist; so der Blattrand von *Marsilia spec.* (2), der Stengel von *Psilotum* (6, a), die erwachsenen Laubblätter von *Lycaste* (50), die grünen Sproßglieder von *Viscum* (69, B).

Auch wo die Epidermiszellen Chromoplasten enthalten, pflegen die Schließzellen der Stomata reine, wenn auch oft nur blasse Chloroplasten zu führen. Doch gibt es Ausnahmen von dieser Regel; so wurden bei folgenden Objekten auch in den Schließzellen Chromoplasten gefunden: *Psilotum* (6); *Selaginella fimbriata* (8), doch hier nur an den im Freien entwickelten, stark geröteten Partien (c), während an den im schwächeren Licht des Laboratoriums hinzuwachsenden Partien (d) die Schließzellen reine Chloroplasten ent-



halten, wie das bei anderen Selaginellen (7, 9) stets der Fall ist; *Hyophorbe Verschaffelti* (nicht bei *H. amaricaulis*); *Thrinax* (34, besonders *b*); junge Lamina von *Olax* (70, *d*); *Cassytha* (74). Am erwachsenen Blatt von *Pholidota imbricata* (58, *a*) wurde sogar beobachtet, daß die fast farblosen Plastiden der Schließzellen kleine orange Grana enthalten, während das in den blaßgrünlichen Plastiden der übrigen Epidermiszellen nicht der Fall ist; ein ähnlicher Fall wurde an der schwächer gefärbten Schattenseite des Stengels von *Cassytha* (74) konstatiert, nur daß hier außer den Schließzellen auch noch in einzelnen zerstreuten Epidermiszellen blaß-orange Chromoplasten vorkommen.

Sehr merkwürdig ist der Einfluß, welchen bei manchen Objekten die Spaltöffnungen resp. Atemhöhlen auf die Ausbildung der Plastiden in den angrenzenden Zellen ausüben. In einem oberen Internodium des grünen Exemplars von *Viscum* (69, *B*), wo die Epidermiszellen gelbe Chromoplasten führen, zeichnen sich die Nebenzellen der Spaltöffnungen durch größere, zahlreichere, intensiver (orange) gefärbte Chromoplasten aus; in einem unteren Internodium derselben Pflanze war die Bevorzugung der Nebenzellen noch auffallender, da die meisten übrigen Epidermiszellen hier nur blasse, grünlichgelbe Plastiden enthielten. Ähnlich liegt die Sache in den Blättern von *Fagraea monantha* (92, *b*), sowie in den gelben Blättern von *Ficus* (68, *A a*), bei welcher letzteren die direkt an die Schließzellen grenzenden Epidermiszellen durch Chromoplasten ausgezeichnet sind, während die meisten übrigen Epidermiszellen Leukoplasten führen. Viel auffallender ist eine analoge Erscheinung bei einem anderen Exemplar von *Ficus* (68, *B a*), bei dem das Schwammparenchym der Blätter im allgemeinen rein grün und die Epidermis durchweg farblos ist; unter jeder Spaltöffnung sieht man hier bei schwacher Vergrößerung einen gelben Fleck, welcher dadurch verursacht ist, daß mehrere Schichten des Schwammparenchyms um die Atemhöhle herum Chromoplasten statt Chloroplasten enthalten; die die Schließzellen umgebenden Epidermiszellen sind hier nicht affiziert. Ein ähnliches Verhalten bieten die Kannen von *Dischidia Rafflesiana* (97): an ihrer blaßgrünen Schattenseite zeichnen sich alle direkt an die Atemhöhlen grenzenden Mesophyllzellen (nicht die Epidermiszellen) durch den Besitz intensiv gelber Chromoplasten aus. An der Lichtseite der Kannen, wo das Mesophyll ohnehin gelbe Chromoplasten



führt, ist diese Erscheinung viel weniger auffallend, aber bei genauem Zusehen zeigt es sich auch hier, daß die Chromoplasten in der nächsten Umgebung der Atemhöhlen deutlich intensiver gefärbt sind als sonst. In den jüngeren Internodien von *Vanilla Walkei* (60, a), wo die äußeren Rindenschichten leukoplastenähnliche Plastiden mit nur wenigen kleinen Granis enthalten, sind in den an Atemhöhlen grenzenden Zellen die Grana zahlreicher und größer, so daß hier die Plastiden schon den Charakter richtiger Chromoplasten haben. Die Lamina von *Botrychium* (1, c) führt überall, auch in der Epidermis, reine Chloroplasten; nur diejenigen Epidermiszellen, welche die Spaltöffnungs-Schließzellen umgeben, enthalten Intermediärplastiden mit mehr oder weniger zahlreichen orangen Granis. Bei diesem Objekt ist jedoch die Erscheinung nicht durchgängig.

Alle diese Fälle, obwohl im einzelnen ziemlich verschieden, haben das gemeinsam, daß in der Umgebung der Atemhöhlen der Chromoplasten-Charakter der Plastiden gesteigert ist. Je nach den spezifischen und lokalen Befähigungen erstreckt sich diese Wirkung entweder auf das angrenzende Mesophyll resp. Rindengewebe, oder auf die Nebenzellen oder sonstige, den Spaltöffnungsapparat umgebende Epidermiszellen, welche ja ebenfalls an die Atemhöhle grenzen; und je nachdem, wie die Plastiden dieser Gewebe ohnehin beschaffen sind, ist die lokal eintretende Steigerung nur eine quantitative, oder aber sie bewirkt eine vollständige Umbildung von Chloroplasten zu typischen Chromoplasten.

Was diese eigentümliche Erscheinung noch merkwürdiger macht, ist, daß sie auch in gerade umgekehrtem Sinne stattfinden kann. So ist im Stengel von *Dischidia Gaudichaudii* (98) das ganze Rindenparenchym von Chromoplasten gelb, aber unter jeder Spaltöffnung befindet sich ein grüner Fleck, indem die den Atemhöhlen angrenzenden Rindenzellen reine Chloroplasten enthalten. Also gerade umgekehrt wie in den oben besprochenen Kannen von *D. Rafflesiana*<sup>1)</sup>. Weitere derartige Fälle wurden beobachtet im Blattstiel von *Thrinax* (34, — hier ist die Differenz nur quantitativ, und die grünen Zellnester befinden sich nicht unter allen Spaltöffnun-

<sup>1)</sup> Leider habe ich von *D. Rafflesiana* nicht auch den Stengel untersucht, es bleibt daher zweifelhaft, ob die beobachtete Differenz eine spezifische oder eine lokale ist.



gen), bei *Lycaste* (50, b) an der Unterseite der erwachsenen Lamina (hier nur auf Epidermiszellen beschränkt). Hierher gehört wohl auch der Fall von *Trichosanthes* (103), in dessen Blattstiel der Kollenchymring stellenweise durch kurze Streifen von Parenchym unterbrochen ist, welche bis zur Epidermis reichen und über denen allein sich die Stomata befinden; in diesen Streifen ist das Gewebe grün, während das übrige peripherische Gewebe reine Chromoplasten enthält. Auch in den Blattscheiden von *Gigantochloa* (31) befinden sich in dem chromoplastenführenden Gewebe grüne Zellnester, welche unter Spaltöffnungen liegen; solche finden sich hier aber nicht unter allen Spaltöffnungen, sondern es kommt auch vor, daß unter solchen gelegene Zellgruppen Chromoplasten enthalten, welche größer und zahlreicher sind als im Nachbargewebe; bei diesem Objekt kommen also die beiden entgegengesetzten Arten von Beeinflussung der Plastiden durch die Stomata gleichzeitig vor.

Fälle von solcher Beeinflussung in der einen oder anderen Richtung hätten sich vielleicht als verbreiteter erwiesen, wenn ich von Anfang an und bei allen Objekten darauf geachtet hätte (einige weniger sicher konstatierte Fälle übergehe ich hier). Durchgreifend ist aber der Einfluß der Spaltöffnungen nicht, denn bei mehreren meiner Objekte habe ich mit Sicherheit seine Abwesenheit festgestellt; z. B. bei *Aloë consobrina* (46, Schlußabsatz), wo im peripherischen Mesophyll Zellen mit verschieden gefärbten Plastiden vorkommen, ist deren Verteilung von den Spaltöffnungen bestimmt unabhängig.

Eine gewisse Analogie mit der Epidermis und den Spaltöffnungen hat die Exodermis der Haft- und Luftwurzeln der Epiphyten mit ihren Durchlaßzellen. Bei *Hoya lacunosa* (99, A) finden sich Chromoplasten zwar nicht in den verkorkten Zellen der Exodermis, wohl aber in den Durchlaßzellen, und zwar erreichen sie gerade hier ihre maximale Entwicklung. Bei *Hoya obovata* (100) kommen Chromoplasten nur in der Exodermis vor, am reichlichsten in den Durchlaßzellen. Auch bei den Luftwurzeln einiger Orchideen, nämlich *Vanda spec.*, *Aërides* (68), *Arachnanthe* (64), wurden Chromoplasten in den Durchlaßzellen und zuweilen auch eine bevorzugte Chromoplastenbildung in den an sie angrenzenden Rindenzellen beobachtet. Allgemein sind diese Beziehungen aber jedenfalls nicht, denn bei *Vanda teres* (61) bestanden sie sicher nicht und die Durchlaßzellen enthielten keine Chromoplasten, obwohl solche in



der Rinde, besonders in den peripherischen Schichten, vorhanden waren.

Endlich habe ich bei einigen Objekten bemerkenswerte Beziehungen der Chromoplasten zu Nektarien und zu Hydathoden, also in beiden Fällen zu sezernierendem Drüsengewebe gefunden. Bei *Passiflora* (89), wo flache Nektarien an der Unterseite der Blattlamina vorhanden sind, finden sich gelbe Chromoplasten (die sonst im Blatt fehlen) zwar anscheinend nicht im Nektariengewebe selbst, wohl aber in dem darüberliegenden, bis zur Oberseite des Blattes reichenden Gewebe. Interessanter sind die Verhältnisse bei den eigenartigen Blattnektarien von *Fagraea monantha* (92, c), wo nicht nur das kleinzellige Drüsengewebe, sondern auch ein ansehnlicher Gewebekomplex in dessen Umgebung Chromoplasten enthält. — Die Hydathoden an der Blattoberseite von *Ficus diversifolia* (68, A d) machen sich äußerlich als winzige, intensiv rote, flache Grübchen bemerkbar, in denen sich eine Gruppe kleiner Spaltöffnungen befindet. Sowohl das kleinzellige Epithem, wie dessen aus zwei Schichten größerer Zellen bestehende Scheide, wie auch die Epidermis in dem Grübchen sind reich an Chromoplasten, während das umgebende Palissadenparenchym reine Chloroplasten, die übrige Epidermis Leukoplasten führt.

Allgemein ist noch zu bemerken, daß, wo in einem Organ Chromoplasten (im engeren Sinn) und Chloroplasten zusammen vorkommen, dieselben gewöhnlich nicht direkt aneinander grenzen, sondern ein mehr oder allmählicher Übergang zwischen beiden durch Vermittlung von Intermediärplastiden stattfindet.

Auch abgesehen von diesen Übergängen kommt es zuweilen vor, daß in demselben Organ oder selbst in derselben Zellschicht reine Chromoplasten neben reinen Chloroplasten und Intermediärplastiden von verschiedener Farbe oder auch neben Leukoplasten vorkommen; gute Beispiele dafür liefert das peripherische Mesophyll in der Blattscheide von *Aloë capitata* (46) und die Epidermis des Blattstiels von *Botrychium* (1, a). Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die verschieden gefärbten Plastiden, soweit gesehen, nie in derselben Zelle vereinigt, sondern auf verschiedene Zellen verteilt sind. Dasselbe gilt auch von der Größe der Plastiden, welche in verschiedenen Zellen erheblich variieren kann, in derselben Zelle aber nie bedeutenden Schwankungen unterliegt. Die Beschaffenheit und speziell auch die Farbe der Plastiden wird



also durch die in den einzelnen Zellen herrschenden Bedingungen bestimmt.

#### IV. Näheres über die Chromoplasten.

Die Form der Chromoplasten ist meist die gleiche wie die der Chloroplasten bei denselben Pflanzen, also, je nachdem sie frei im Plasma oder im Wandbeleg liegen, ungefähr kugelig oder plankonvex mit, von der Fläche gesehen, rundlichem Umriß, zuweilen ein wenig gestreckt; stärker gestreckte (bis höchstens nicht ganz doppelt so lang als breit) dürften wohl immer in Vorbereitung zur Teilung sein. Andere Formen wurden nur ausnahmsweise beobachtet, z. B. linsenförmige bei einer unbestimmten Bignoniacee (102); flache, dünne Scheiben von rundlichem, zuweilen auch etwas unregelmäßigem Umriß bei *Bambusa vulgaris*, *Verschaffeltia* (36), *Rhynchosyilis* (62), *Gastrodia* (67); mäßig gestreckte und gebogene oder sonst unregelmäßig geformte (neben normalen) bei *Lycopodium* (5), *Lycaste* (50), *Renanthera Arachnites*. Bei den *Selaginella*-Arten kommen dieselben, z. T. eigentümlichen Formen vor, welche durch Haberlandt (4) für die Chloroplasten dieser Pflanzen bekannt sind. Spindelförmige Chromoplasten, wie sie in Blüten und Früchten nicht selten sind, wurden in vegetativen Organen nur bei einem Objekt beobachtet, nämlich in der Stengelrinde der saprophytischen Orchidee *Galeola Hydra* (65), während in Epidermis und Haaren die Chromoplasten auch hier rund sind.

In Teilung begriffene Chromoplasten (kenntlich an der gestreckten, biskuitförmig eingeschnürten Form und der häufigen paarweisen Zusammenlagerung der runden Formen) sind in jungen, noch lebhaft wachsenden Organen allgemein, wurden aber mehrere Male auch in völlig ausgewachsenen Organen noch in größerer Zahl angetroffen, so bei *Cocos* (32), *Stevensonia* (33), und besonders reichlich bei der unbestimmten Bignoniacee (102).

Auch die Dimensionen der Chromoplasten entsprechen denen der übrigen Plastiden desselben Objekts. Die größten habe ich bei *Botrychium* (1) angetroffen, wo sie bis zu  $15.7 \times 11.5 \mu$  erreichen; auch bei den *Selaginella*-Arten werden die Chromoplasten relativ sehr groß. Bei den übrigen Objekten können Chromoplasten von 4—5  $\mu$  Durchmesser schon als groß gelten; *Croton* (86), wo in der Stengelrinde die runden Chromoplasten bis 5.7, die gestreckten bis



8.5 × 4.5  $\mu$  Durchmesser haben, ist schon ein exzeptioneller Fall. Die gewöhnlich bedeutend kleineren Chromoplasten der Epidermis erreichen selten mehr als 2–2½  $\mu$ ; noch erheblich kleiner sind sie in prosenchymatischen Zellen, z. B. in Sklerenchymfasern. Bei einigen Objekten, wie z. B. im Stengel von *Lycopodium*, sind die Chromoplasten in allen Geweben winzig.

Die Anordnung in der Zelle bietet in der Regel nichts Charakteristisches; meist sind die Chromoplasten ungefähr gleichmäßig im Plasma zerstreut, und nur in einzelnen Fällen wurde eine bestimmte Lagerung angetroffen. z. B. ausschließlich um den Zellkern in dichtem Kranz in den Kurzzellen der Zweigepidermis von *Bambusa spec.* (29), ausschließlich an der Innenwand in den gleichen Zellen von *Bambusa nana* (30).

Bei vielen Pflanzen sind die Chromoplasten sehr empfindlich gegen die geringste Verletzung der Zelle, so daß man sie nur in ganz intakten Zellen in ihrem natürlichen Zustande beobachten kann; an angeschnittenen oder austrocknenden Zellen quellen sie zunächst auf und zerfallen bald ganz, so daß von ihnen nur die farbigen Grana übrigbleiben, welche leicht zu größeren Tropfen zusammenfließen. An diesen Zerfallsprodukten kann man günstigenfalls auch in schon vertrockneten Pflanzenteilen noch erkennen, ob und in welchen Zellen sie Chromoplasten enthalten haben; darauf war ich in den wenigen Fällen angewiesen, wo ich die gesammelten Pflanzen nicht bald mikroskopisch untersuchen konnte.

Bekanntlich ist in den Chromoplasten das Pigment entweder in Form runder „Grana“ oder (viel seltener) in Form von Kristallen dem Stroma eingelagert. Der letztere Fall ist unter den von mir untersuchten Objekten nur ein einziges Mal realisiert, nämlich im Rindengewebe (nicht in der Epidermis und den Haaren) der saprophytischen Orchidee *Galeola* (65), wo die exzeptionelle, spindelförmige Gestalt der Chromoplasten durch die Einlagerung mehrerer äußerst feiner und nur mit Mühe erkennbarer, nadelförmiger Kriställchen von gelber Farbe bedingt wird.

Das Vorhandensein farbiger Grana ist in den Fällen, wo die Struktur der Chromoplasten relativ grob ist, schon bei mäßig starker Vergrößerung (stärkeres Trockensystem) mit oft voller Deutlichkeit zu sehen, bei *Botrychium* sogar schon bei kaum 100-facher Vergrößerung. Für gewöhnlich ist aber zu einer genaueren Einsicht in die Struktur der Chromoplasten eine gute Ölimmersion nicht



zu entbehren, und die klarsten Bilder erhält man bei weit geöffnetem Diaphragma des Abbe'schen Beleuchtungsapparates, wobei bekanntlich das Strukturbild schwindet, das Farbenbild aber um so besser hervortritt.

Bei einigen wenigen Objekten erschienen die Chromoplasten selbst bei der stärksten Vergrößerung, über die ich verfügte, meist homogen gefärbt. Ich zweifle aber nicht, daß auch in diesen Fällen eine granulöse Struktur vorhanden ist und nur wegen der äußersten Kleinheit bei dichter Lagerung der Grana nicht erkannt werden kann. Hiefür spricht, daß manchmal die Unterscheidung der Grana bei besonders günstiger Beleuchtung oder an einzelnen, wohl etwas gröber gebauten Chromoplasten doch gelang, sowie daß sie manchmal zwar nicht an intakten, wohl aber an verquellenden Chromoplasten möglich war. Nur in den winzigen Chromoplasten des Schwellgewebes von *Stangeria* (18) und in denen der saprophytischen Orchidee *Gastrodia javanica* (67) gelang es mir nicht, mich von der granulösen Struktur zu überzeugen; das sind aber Objekte, die ich nur ziemlich flüchtig untersuchen konnte.

Schwer zu sehen sind die Grana auch dann, wenn sie hellgelb in hellgrünem Stroma sind, wie bei den meisten Chromoplasten von *Arachnanthe* (64) und bei *Passiflora* (89); bei dem letzteren Objekt konnte ich mich nur mit Hilfe der im folgenden Kapitel zu besprechenden Karotinreaktion von ihrer Anwesenheit überzeugen.

Die relative Masse der beiden Bestandteile der Chromoplasten: Stroma und Grana, kann auch innerhalb desselben Organs in dessen verschiedenen Zonen in den weitesten Grenzen variieren. In den caeteris paribus am intensivsten gefärbten, also gewissermaßen am meisten typischen Chromoplasten, wie sie sich in den Zonen ihrer maximalen Ausbildung zu finden pflegen, füllen die Grana oft die ganze Plastide in gleichmäßig dichter, undurchsichtiger Masse aus; in solchem Fall erscheint der Chromoplast auf den ersten Blick homogen gefärbt, aber bei näherer Untersuchung ist die granulöse Struktur, wenn sie nicht gar zu fein ist, wenigstens an seinem Rande erkennbar; die Erkennung derselben kann durch vorsichtige Aufhellung mittels Glyzerin erleichtert werden, welches man in verdünntem Zustande zusetzt und sich langsam konzentrieren läßt. — Das zweite Extrem, mit dem ersteren durch alle erdenklichen Übergänge verbunden, bieten die Fälle, wo im Stroma nur ganz wenige, winzige Grana zerstreut liegen.



Die Größe der Grana kann ebenfalls innerhalb desselben Organs bedeutend schwanken, ist aber auch oft für bestimmte Objekte charakteristisch. Sehr kleine Grana finden sich z. B. im Stengel von *Lycopodium* (5), in allen Organen der *Gnetum*-Arten (24—27), bei *Olax* (70), *Castanospermum* (82), *Landolphia* (94). Relativ grob sind sie hingegen bei *Botrychium* (1), \* *Pothos* (89), *Smilax* (42), \* *Vanilla Walkeriae* (60), *Croton* (86, in der Rinde), *Pseudopanax* (90), im inneren Gewebe der Kannen von \* *Dischidia Rafflesiana* (97) u. a. Große und kleine Grana durcheinander in denselben Chromoplasten finden sich z. B. bei *Macrozamia Denissonii* (16), *Pholidota imbricata* (58) und manchen anderen Objekten. Natürlich steht die relative Menge der Grana im allgemeinen in umgekehrtem Verhältnis zu ihren Dimensionen. Bei den mit \* bezeichneten Objekten der obigen Liste findet man oft nur wenige grobe Grana pro Plastide, ja es kommen bei ihnen sogar Chromoplasten vor, die nur ein großes Granum enthalten; derartige Chromoplasten sehen recht abweichend vom Typus aus, und man würde sie kaum für solche halten, wenn man sie nicht im selben Gesichtsfeld durch alle Übergänge mit typischen Chromoplasten verbunden sähe.

Am häufigsten sind die Grana ziemlich gleichmäßig im ganzen Stroma der Plastide verteilt. Verhältnismäßig selten findet man sie gruppenweise genähert, oder vorwiegend bis ausschließlich im zentralen Teil des Stromas zusammengehäuft, so daß bei schwächerer Vergrößerung ein farbiges Zentrum von einem farblosen oder grünlichen Saum umgeben ist; so z. B. bei *Araucaria* (21), *Coelogyne miniata*, Knolle (58), *Fagraea monantha* (92, a, b). Häufiger ist der umgekehrte Fall, daß die Grana vorwiegend oder ausschließlich peripherisch angeordnet sind; wenn sie dabei zahlreich sind, so können sie einen zusammenhängenden, schmalen farbigen Saum oder breiteren Ring um ein farbloses oder blaßgrünes Zentrum bilden, so daß die Chromoplasten bei schwächerer Vergrößerung hohl zu sein scheinen. Als Beispiele für dieses extreme Verhalten seien genannt: *Gnetum spec.* (26), wo die winzigen Grana in mehreren Schichten an der Peripherie gedrängt sind, und die Epidermis des Blattstiels von *Vanilla africana* (59, a). Diese Lagerungsverhältnisse pflegen übrigens nicht ganz konstant zu sein.

Wo die Grana nicht allzu winzig sind, so daß man über ihre Form urteilen kann, erscheinen sie meist deutlich kugelig; es sind wahrscheinlich Tropfen einer ölartigen Substanz, in der das Pigment



gelöst ist. Aber in einer ansehnlichen Anzahl von Fällen erscheinen die Grana, wenigstens die größeren, vielmehr als eckige oder etwas unregelmäßig geformte Körner; so z. B. bei *Botrychium* (1), *Selaginella*-Arten (7, 8), \* *Macrozamia Denisonii* (16), *Gnetum funiculare* (24), \* *Bambusa nana* (30), \* *Zamioculcas* (40), \* *Grammatophyllum* (55), *Disciphania* (71). bei dieser z. T. von gestreckter Form. Doch halte ich es für sehr wahrscheinlich, daß die scheinbaren Körner in Wirklichkeit dichtgedrängte Gruppen kleiner Tröpfchen sind; bei den mit \* bezeichneten Objekten habe ich mich durch direkte Beobachtung davon überzeugt, bei manchen anderen spricht dafür die Tatsache, daß in verquellenden Chromoplasten nur winzige Tröpfchen zu sehen sind.

Ein ganz isoliert dastehender Fall wurde bei *Hoya lacunosa* (99) beobachtet, wo die Grana den Eindruck von Hohlkügeln machen. Sie verhalten sich hier auch sonst ungewöhnlich (vgl. Kap. V).

Die Farbe der Grana ist am häufigsten orange oder gelb in verschiedenen Tönen und Abstufungen; bei einigen Objekten kommen beide Farben zugleich vor, aber in verschiedenen Partien des Organs oder wenigstens in verschiedenen Zellen, so z. B. in der Epidermis der Zweige von *Bambusa spec.* (29) in den Langzellen gelb, in den Kurzzellen orange. Rein braune oder gelbbraune Grana sind sehr selten, ich fand sie nur bei *Stangeria* (18) in den Intermediärplastiden der Übergangszone, *Cassia alata* (80) und *Trichosanthes* (103). Auch rein rote (nicht orangerote) Grana sind verhältnismäßig selten, aber meist für ganze Gattungen oder größere systematische Gruppen charakteristisch: *Marsilia* (2—4); *Selaginella* (7—14); alle Gymnospermen (15—27) mit Ausnahme von *Macrozamia secunda* (17) und *Stangeria* (18); *Freyinetia* (28); die *Aloineae* (43—47); viele, aber nicht alle *Orchideae*, z. B. *Liparis* (51), *Coelogyne*-Arten (53, 54); von Dikotylen nur *Roydsia* (75). Bräunlichrot bis ausgesprochen braunrot sind die Grana (z. T. neben blutroten) bei *Botrychium* (1, — hier in der Epidermis orange), *Selaginella spec.* (11), *Encephalartos* (15), *Coelogyne Dayana* (Luftwurzel), *Vanilla africana*, Blattstiel (58, a). Die wahre Farbe der Grana tritt oft erst bei Immersion und geöffnetem Abbe hervor; so erweisen sich unter diesen Bedingungen die Grana von *Marsilia spec.* (2) als blutrot, während sie bei schwächerer Vergrößerung fast schwarz erscheinen; oft scheinen dunkel orangefarbige Grana bei schwächerer Vergrößerung rot zu sein.



Das Stroma der Chromoplasten ist direkt nur dann zu sehen, wenn diese nicht gar zu dicht von Granis erfüllt sind; ist letzteres der Fall, so kann man seine Anwesenheit nur indirekt aus der Tatsache erschließen, daß die Grana im lebenden Chromoplasten ein bestimmt geformtes Ganze bilden, also offenbar durch eine Kittsubstanz zusammengehalten werden, während beim Verquellen dieser Zusammenhang aufhört und die Grana sich voneinander trennen. Übrigens pflegt auch bei dicht gelagerten, aber groben Granis das Stroma wenigstens am Rande der Plastide in den Einkerbungen zwischen den äußersten Granis sichtbar zu sein. Bei *Pothos* (39) war trotz der groben Struktur der Chromoplasten das Stroma am lebenden Objekt nicht erkennbar, es ließ sich aber durch Behandlung mit Jodjodkali deutlich machen; bei *Hoya lacunosa* hingegen (99) führte dieses Mittel nicht zum Ziel, und die Sache blieb mir hier unklar.

Wo größere Partien des Stromas sichtbar sind, bemerkte ich bei Beobachtung mit Immersion und geöffnetem Abbe oft zu meiner Überraschung, daß das Stroma nicht ganz farblos, sondern merklich blaßgrünlich gefärbt ist, obwohl davon bei engerem Diaphragma nichts zu sehen war. Das erwies sich als so verbreitet und bei manchen Objekten allgemein, daß mir zunächst Zweifel aufstiegen ob denn überhaupt in vegetativen Organen reine Chromoplasten mit ganz farblosem Stroma vorkommen. Ich richtete daher auf diesen Punkt besonders mein Augenmerk und überzeugte mich, daß absolute Farblosigkeit des Stromas mindestens ebenso häufig vorkommt wie grünliche Färbung desselben; oft findet man aber beides nebeneinander in demselben Organ. Besonders verbreitet ist vollkommene Farblosigkeit des Stromas in der Epidermis und der inneren Partie dickerer Organe, deren Chromoplasten meist nicht als modifizierte Chloroplasten, sondern als modifizierte Leukoplasten aufzufassen sind; aber auch in den dem Chlorenchym entsprechenden Gewebepartien finden sich vielfach reine Chromoplasten, und bei einer Anzahl von Objekten konnte ich mich überzeugen, daß die Plastiden durchgängig farbloses Stroma haben, so daß also die betr. Organe überhaupt kein mikroskopisch nachweisbares Chlorophyll enthalten. Solche Objekte sind mit Sicherheit: der Stengel von *Lycopodium* (5), die Blattstiele und Schwellpolster von *Cocos* (32), die Rhachis und der Blattrand von *Stevensonia* (33), die Blattstiele und gelben Stengel von *Alsomitra* (104), die gelbe Form von



*Cassytha* (74), die Haftwurzeln von *Dischidia Gaudichaudii* (98), — nicht zu reden von den im Boden oder Humus ganz verbor- genen Organen. Mit Wahrscheinlichkeit gehört hierher noch eine Reihe anderer Fälle. Überall da nämlich, wo das Stroma nicht direkt sichtbar ist, läßt sich nur aus dem Grade der Reinheit der Gesamtfärbung der Chromoplasten schließen, ob ihr Stroma grünlich ist oder nicht; und solche Schlüsse können keinen Anspruch auf Sicherheit machen.

Außer diesen Plastiden mit nur bei offenem Abbe erkennbarer grünlicher Farbe des Stromas, welche ich noch zu den eigentlichen oder typischen (wenn auch nicht „reinen“) Chromoplasten zähle, gibt es ferner solche, wo die Grünfärbung des Stromas, wenn auch nur blaß, doch ohne weiteres sichtbar ist oder bei dicht granulöser Struktur sich in der Mischfarbe der ganzen Plastide (grünlichgelb, braun, bei schwacher Vergrößerung manchmal fast schwarz) deutlich zu erkennen gibt. Das sind die eigentlichen Intermediärplastiden, welche die Charaktere von Chromoplasten und Chloroplasten in annähernd gleichem Maße in sich vereinigen. Ich rechne sie in dieser Arbeit mit zu den Chromoplasten im weiteren Sinn, man kann sie aber mit gleichem Recht auch zu den Chloroplasten im weiteren Sinn rechnen. Derartige Intermediärplastiden finden sich sehr häufig zusammen mit typischen Chromoplasten und typischen Chloroplasten, indem sie in der Grenzregion zwischen beiden den Übergang von den einen zu den anderen vermitteln; der Übergang erfolgt bald mehr oder weniger rapide, bald ganz allmählich auf längerer Strecke, und es kann als Regel gelten, daß je mehr der Chlorophyllgehalt im Stroma zunimmt, umso mehr die Zahl und Größe der farbigen Grana abnimmt. Es gibt aber auch Objekte, in denen die meisten oder selbst alle Plastiden solche Mischgebilde sind, während typische Chromoplasten und eventuell auch typische Chloroplasten ganz fehlen; solche Objekte sind z. B.: Blattstiel und Rhachis von *Botrychium* (1), die Blätter der braunen Form von *Selaginella spec.* (9), das noch wachsende Blatt und der Stamm von *Freyinetia* (28), das Blatt von *Gasteria cheilophylla* (44), die erwachsenen und jungen Blätter von *Pholidota imbricata* (58), die Zweige und jungen Blätter von *Olaux* (70), und manche andere, besonders in jungem Zustande.

Weiter gibt es Plastiden, deren Stroma ebenso oder fast ebenso grün ist wie bei reinen Chromoplasten, welche aber daneben far-



bige Grana in meist nur geringer Zahl enthalten, was ihnen bei schwächerer Vergrößerung eine gelblichgrüne, bräunlichgrüne oder schmutziggrüne Gesamtfärbung verleiht. Auch diese den typischen Chloroplasten schon sehr nahe stehenden Mischgebilde finden sich häufig in der Grenzregion zwischen Chromoplasten resp. Intermediärplastiden und reinen Chloroplasten. Ich bin aber auch einigen wenigen Objekten begegnet, wo diese Kategorie von Plastiden dominiert oder ausschließlich vorkommt; ersteres ist in den Luftwurzeln von *Arachnanthe* (64) der Fall (daneben an bestimmten Stellen reine gelbe Chromoplasten), letzteres in den Internodien und Blattstielen einer unbestimmten Lauracee (78). Wenn man die nicht selten vorkommenden gelbgrünen und schmutziggrünen Organe darauthin genauer untersuchte, so würden sich vielleicht derartige Vorkommnisse als recht verbreitet erweisen und die Zahl der Fälle wenn auch nicht von eigentlichen Chromoplasten, so doch von farbigen Granis in vegetativen Organen sich erheblich vermehren.

Entsprechend den Übergängen zwischen Chromo- und Chloroplasten gibt es auch Übergänge zwischen Chromo- und Leukoplasten. Hier ist die Sache allerdings schwieriger zu beurteilen, da die Leukoplasten keine positiven Merkmale besitzen, sondern nur negativ, durch den Mangel jeglichen Farbstoffes, charakterisiert sind. Wenn man aber Plastiden, welche in der Größe mit Leukoplasten übereinstimmen, aber grünlich oder blaßgrün gefärbt sind (wie das z. B. in der Epidermis vieler Pflanzen der Fall ist), als intermediär zwischen Leukoplasten und Chloroplasten betrachten muß, so müssen auch leukoplastenähnliche Gebilde, welche in ganz farblosem Stroma spärliche farbige Grana führen, als intermediär zwischen Leuko- und Chromoplasten anerkannt werden; und je nach der relativen Zahl und Größe der Grana kann man auch hier eine Reihe von Übergängen zwischen den beiden Extremen statuieren. Solche „Chromo-Leukoplasten“ habe ich vielfach beobachtet; insbesondere gehören viele der Chromoplasten in der Epidermis und in dem makroskopisch farblosen inneren Gewebe dickerer Organe, genau genommen, hierher.

Manchmal finden sich in demselben Organ alle Arten von Übergangplastiden vereinigt. So enthält im Schwimmblatt von *Marsilia quadrifolia* (3) die obere Epidermis Chloro-Leukoplasten, die untere Epidermis Chromo-Leukoplasten, und die subepidermale Schicht



der Unterseite Chromo-Chloroplasten. In den Blättchen von *Marsilia spec.* (2, c) führt die oberseitige Epidermis in einer schmalen Randzone Chromo-Leukoplasten, im übrigen Chloro-Leukoplasten; an der Grenze beider Regionen finden sich Zellen, deren Plastiden in blaßgrünem Stroma einzelne rote Grana enthalten, also ein Gemisch der Charaktere aller drei Kategorien von Plastiden repräsentieren. In den jüngeren Internodien von *Vanilla Walkeriae* (60, a) finden sich in der Epidermis reine Leukoplasten, in der subepidermalen Schicht führen dieselben wenige kleine, dunkel-orange Grana, in der dritten Schicht ist überdies das Stroma blaßgrün gefärbt, also die Charaktere von Leuko-, Chromo- und Chloroplasten vereinigt; in den folgenden Schichten werden die Plastiden größer und tiefer grün, während die Grana unverändert bleiben, sie gehen also in Chromo-Chloroplasten über.

Die Chromoplasten bilden in sehr vielen Objekten Stärke; in einem Teil dieser Fälle ließe sich vielleicht die Stärkebildung auf den Chlorophyllgehalt des Stromas zurückführen, doch ist es nicht erforderlich, zu dieser Annahme zu greifen, da sich die Stärke oft auch in sicher ganz chlorophyllfreien Chromoplasten findet, z. B. im inneren Gewebe des Blattstieles von *Cocos* (32), im Stengel von *Dischidia Gaudichaudii* (98), in den Wurzeln von *Hoya lacunosa* (99). Bald ist es feinkörnige Stärke, welche die Gestalt der Chromoplasten nicht beeinflußt, bald sind es wenige mittelgroße Körner, bald auch einzelne ziemlich große Körner, welche die ursprüngliche Größe der Plastide bei weitem übertreffen. In den letztgenannten Fällen wird oft durch die Stärkeproduktion die Erkennung der Chromoplasten erschwert, indem dieselben durch die starken Dehnungen deformiert und lokal ganz unkenntlich werden; dank den Granis kann man aber meist den Chromoplastenrest, der zwischen mehreren Stärkekörnern eingezwängt ist, oder dem Ende einzelner größerer Körner als eine kleine Kappe aufsitzt, doch auffinden. Wo die Erkennung der Grana an unveränderten Chromoplasten durch deren sehr dichte Struktur vereitelt wird, kann die Stärkebildung sogar zu einem Hilfsmittel der Untersuchung werden, weil in den stärker gedehnten Partien der Chromoplastensubstanz die Grana als getrennte farbige Punkte auf dem Stärkekorn deutlich sichtbar sind.



## V. Die Farbstoffe.

Es ist bekannt, daß die Farbstoffe der Chromoplasten der Blüten und Früchte, ebenso wie derjenigen der *Daucus*-Wurzel, ein Karotin sind oder, genauer gesagt, zu der Gruppe der Karotine (im weiteren Sinne) gehören. Um festzustellen, ob dasselbe auch für die Farbstoffe der von mir untersuchten Chromoplasten gilt, benutzte ich die bekannte Karotin-Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure, und zwar in einer meines Wissens bisher nicht angewandten Weise, indem ich das Reagens unter dem Mikroskop direkt auf die lebenden Plastiden einwirken ließ. Die herrschende Meinung ist, daß die Schwefelsäure-Reaktion nur an austrockneten, also abgestorbenen Objekten ausführbar sei; Tammes (9, S. 214) betont ausdrücklich, daß, wenn die Schnitte „auch nur im geringsten feucht sind“, die Reaktion ausbleibt oder nicht charakteristisch ausfällt; sie trocknet daher die Schnitte im Exsikkator und behandelt sie dann mit Schwefelsäure makroskopisch auf weißer Unterlage. Ich habe dies Verfahren anzuwenden versucht, sowohl makroskopisch, wie mikroskopisch, war aber von den Ergebnissen nicht befriedigt, namentlich weil die reichlich eingebrungene Luft sehr störend wirkte. Ich überzeugte mich aber bald, daß das Austrocknen ganz überflüssig ist. Ich adoptierte schließlich folgendes Verfahren: Frische Schnitte vom lebenden Objekt wurden in einen Tropfen Wasser auf dem Objektträger gebracht, das Wasser abgesogen, so daß die Schnitte nur feucht blieben, dann mit Deckglas bedeckt, und nun wurde seitlich ein ziemlich großer Tropfen Schwefelsäure zugesetzt; kam es auf eine sehr starke Wirkung der Säure an, so brachte ich einen Tropfen derselben direkt auf den Schnitt und legte dann sofort das Deckglas auf. Dabei ist aber Bedingung, daß die Schwefelsäure ganz konzentriert und nicht durch längeres Stehen in einem mangelhaft verschlossenen oder häufig geöffneten Fläschchen verdünnt sei. In der ersten Periode meiner Untersuchung, wo ich derartige ungenügend konzentrierte Säure benutzte, fiel daher die Reaktion oft negativ oder zweifelhaft aus. Als ich aber später frisches Reagens erhielt, gelang die Reaktion bei fast sämtlichen Objekten ganz ausgezeichnet; die Grana färben sich intensiv und leuchtend himmelblau, und ein so behandelter, an Chromoplasten reicher Schnitt ergibt ein ganz wunderbares Bild. Natürlich spielen die Schnelligkeit des



Eindringens der Säure, ihre Verdünnung durch das dem Schnitt anhaftende Wasser und den Zellsaft, die Dicke des Schnittes und andere schwer zu berücksichtigende Umstände eine Rolle; großer Harzgehalt des Präparates oder andere Inhaltsstoffe der Zellen können dem Eindringen der Säure hinderlich sein; manchmal geben die Membranen, besonders die Kutikula, oder gewisse Inhaltsstoffe, namentlich in der Epidermis, störende Färbungen mit der Schwefelsäure, und endlich geht die blaue Färbung der Grana meist mehr oder weniger schnell, zuweilen sehr schnell vorüber. Kein Wunder daher, daß man nicht immer beim ersten Versuch eine schöne Reaktion erhält; in der Regel gelingt sie aber sofort und erreicht in wenigen Sekunden ihren Höhepunkt. Dieses Verfahren hat gegenüber dem von Tammes angewandten den großen Vorzug, daß die Reaktion streng lokalisiert ist und man sich überzeugen kann, daß es die Grana selbst, und zwar nur diese sind, welche sich färben; dazu kommt der Vorzug der größeren Schnelligkeit. Dieselben Vorzüge hat mein Verfahren auch gegenüber der Molisch'schen Kali-Methode des Karotinnachweises, bei welcher nach tage- oder wochenlangem Verweilen der Objekte resp. Schnitte in kalihaltigem Alkohol das Karotin auskristallisiert, aber wohl schwerlich an den Stellen, ja vielleicht nicht einmal in denselben Zellen, wo es sich im lebenden Objekt befand; natürlich hat aber diese Methode auch ihre großen Vorteile.

Im speziellen Teil sind die Objekte, bei denen die Karotinreaktion ein unzweideutiges (meist ganz ausgezeichnetes) Ergebnis lieferte, durch das Zeichen \* vor dem Namen hervorgehoben; es sind das fast alle, bei denen ich sie überhaupt habe anwenden können. Nur bei einigen wenigen Objekten erhielt ich keine ganz typische Reaktion, nämlich bei folgenden:

Die blaue Färbung war nicht so rein und leuchtend wie sonst bei *Psilotum* (6); *Encephalartos* (15), hier blauschwarz; *Hoya lacunosa* (99), fast schwarz; *Galeola* (65, mit nadelförmigen Pigmentkriställchen), etwas blaß; *Citharexylon* (101), graublau. Bei mehreren dieser Objekte verlief überdies die Reaktion ungewöhnlich langsam; ebenso bei *Dammara spec.* (20), *Arachmanthe* (64) und *Trichosanthes* (103), bei denen aber schließlich doch eine schöne Bläuung eintrat. Keine Blaufärbung konnte ich bei *Agathis borneensis* (19) erzielen, vielleicht wegen des großen Harzgehaltes.

Hervorzuheben ist, daß die gelb, orange, rot, braunrot und braun



gefärbten Grana mit Schwefelsäure den gleichen blauen Farbenton annehmen, was wohl für eine nahe Verwandtschaft der betr. Farbstoffe spricht.

Das farblose Stroma der Chromoplasten bleibt bei der Reaktion farblos und erfährt nur eine gewisse Quellung; ist aber das Stroma grünlich, so nimmt es eine diffuse blaugrüne oder hellbläuliche Farbe an, deren Intensität mit derjenigen des ursprünglichen Grüns steigt, welche aber immer so blaß ist, daß die intensiv gebläuten Grana sich sehr scharf von ihr abheben. Dieselbe helle, diffuse Färbung nehmen auch reine Chloroplasten an. Es fragt sich, ob diese Färbung durch einen diffusen Karotingehalt des Stromas bedingt ist, oder auf der bekannten Bläuung des Chlorophylls selbst durch Säuren beruht. Das letztere muß zutreffen, denn in einigen Fällen, wo ich den Verlauf der Reaktion näher verfolgen konnte, ging die Färbung des Stromas derjenigen der Grana voraus; wäre aber erstere durch einen geringen Gehalt derselben Substanz bedingt, welche in den Granis konzentriert vorliegt, so müßte man erwarten, daß sie später als bei diesen eintritt. So liefert die Schwefelsäurereaktion zugleich einen Wahrscheinlichkeitsbeweis dafür, daß die grünliche Färbung des Stromas von Chlorophyll herrührt. Das grüne Stroma färbt sich in solchen Fällen zunächst bräunlich (wohl Chlorophyllanbildung!), dann bläulich resp. blaugrün; die Grana sind in diesem Moment dunkelbraun oder rotbraun und werden erst später blau. Meist erfolgt aber die Reaktion so rasch, daß die Grana momentan die intensiv blaue Farbe annehmen.

Bei *Galeola Hydra* beobachtete ich bei dem hier langsamen Verlauf der Reaktion, daß die hellgelben Kristallnadeln zunächst sich braun färbten und deutlicher hervortraten; alsbald zerfielen sie in eine Reihe von Körnchen, die sich allmählich bläuten.

Dank der leuchtenden Farbe, welche die Grana und eventuell die ganzen Chromoplasten bei der Karotinreaktion annehmen, hat mir diese mehrere Male als Hilfsmethode auch zu anderweitigen Zwecken Dienste geleistet. So erleichtert sie die Auffindung der winzigen, zerstreuten Chromoplasten, wie sie in Sklerenchymfasern und engen Elementen der Leitstränge vorkommen; ferner treten blasse Grana, besonders blaßgelbe in hellgrünem Stroma, nach der Blaufärbung viel deutlicher hervor, und in besonders schwierigen Fällen, nämlich bei *Passiflora* (89) und in jüngeren Blattstielen



von *Albertisia* (72), konnte ich mich nur dank der Karotinreaktion von ihrer Anwesenheit überzeugen.

Wie neuerdings Tswett (11) hervorhebt, ist die Bläuung mit Schwefelsäure (die sogenannte Lipochrom-Reaktion) keineswegs für die eigentlichen Karotine, welche chemisch Kohlenwasserstoffe sind, charakteristisch, sondern sie ist ihnen mit einer ganzen Reihe von gelben Farbstoffen gemeinsam, für welche Tswett die Bezeichnung „Karotinoide“ vorschlägt und zu denen auch die anscheinend sauerstoffhaltigen „Xanthophylle“ der Chloroplasten gehören; nach ihm ist die Anwesenheit der eigentlichen Karotine in Blüten und Früchten nicht erwiesen. Daß aber in unserem Fall wirklich Karotine im engeren Sinn anwesend sein müssen, geht aus den gleich zu besprechenden Extraktionsversuchen hervor; denn nach Tswett ist Karotin der einzige von den gelben Plastiden-Farbstoffen, welcher durch reinen Petroläther extrahierbar ist.

Um näheren Aufschluß über die Farbstoffe der Chromoplasten zu erzielen, versuchte ich, aus mehreren charakteristischen Objekten, welche mir in nicht zu geringer Menge zur Verfügung standen, die Farbstoffe zu extrahieren. Es waren folgende:

- 1) Die roten Knollen von *Coelogyne miniata*, mit Ausschluß der grünlichen zentralen Partien,
- 2) tiefgelbe Stengel von *Cassytha filiformis*,
- 3) die peripherische, am stärksten gelb gefärbte Partie der Blattstiele einer gelben Form von *Cocos nucifera*,
- 4) die orangen Blattstiele von *Gonocaryum fuscum*,
- 5) die am reinsten rot gefärbten Teile der Stengel von *Selaginella laevigata*,
- 6) die hell braunroten jungen Internodien und Blattstiele von *Gnetum funiculare*.

Das sind also sehr verschiedene und auch verschieden gefärbte Organe von Pflanzen aus allen Klassen des Systems.

Die Organe wurden klein zerschnitten und an der Luft oder im Exsikkator getrocknet (wobei sich Nr. 6 schwärzte) und dann wiederholt und längere Zeit im Dunkeln mit Petroläther behandelt, um das Karotin von den eventuell vorhandenen anderen Farbstoffen zu trennen; in einigen Fällen wurde die Substanz zerrieben und im Extraktionsapparat mit Petroläther extrahiert<sup>1)</sup>. In allen Fällen

<sup>1)</sup> Für die Ausführung dieser Prozedur bin ich Herrn Decker vom Agrikulturchemischen Laboratorium in Buitenzorg zu Dank verpflichtet.



wurde eine gelbe bis orange-gelbe Lösung erhalten, auch bei den Objekten mit roten Granis. Wenn der Petroläther keinen Farbstoff mehr aufnahm, wurde nunmehr mit Alkohol behandelt; dieser lieferte ein Extrakt, welches bei Nr. 1 und 5 gelbbraun, bei Nr. 2 und 3 hellgelb, bei Nr. 4 hellgrünlichgelb, bei Nr. 6 tief dunkelbraun (Extraktion des beim Trocknen gebildeten schwarzbraunen Pigments!) gefärbt war. Von den beiden Extrakten aus Nr. 1, welche reichlich genug vorhanden waren, wurde je ein Teil eingedampft; das Petroläther-Extrakt gab einen orangeroten, etwas syrupösen Rückstand, der am Licht allmählich farblos wurde; das Alkoholextrakt gab einen gelbbraunen Syrup.

Die spektroskopische Untersuchung wurde bei Nr. 5 und 6 mit einem kleinen Handspektroskop, bei den übrigen mit einem Spektrophotometer von Schmidt & Haensch vorgenommen. Sie ergab nicht die erwarteten Resultate, indem ich in den Spektren der Petroläther-Extrakte niemals distinkte Bänder erkennen konnte, sondern nur eine kontinuierliche Absorption des violetten Endes, die je nach Objekt und Schichtdicke schon im Grün oder erst im Blau begann; ob das an den Apparaten oder an meinen Augen lag, weiß ich nicht, jedenfalls spricht das nicht gegen die Karotinnatur des Pigments, denn ein vergleichshalber untersuchtes Petroläther-Extrakt aus *Daucus*-Wurzeln verhielt sich ebenso. Die Alkoholextrakte ergaben ebenfalls eine Endabsorption, deren Beginn aber weniger scharf begrenzt war, daneben zuweilen eine Verdüsterung des Rot und des Grün. Bei der größten verfügbaren Schichtdicke zeigte überdies das Petroläther-Extrakt von Nr. 1—4 eine Andeutung des Chlorophyllbandes I, welche bei *Cocos* und *Gonocaryum* äußerst schwach, bei *Coelogyne* wenig stärker, bei *Cassyth*a hingegen ganz deutlich war; die Lage dieses Bandes war dieselbe, wie im Spektrum einer Chlorophylllösung. Die Alkoholextrakte von Nr. 1—3 (von Nr. 4 war zu wenig davon vorhanden) zeigten hingegen keine Spur des Chlorophyllbandes, die geringe vorhandene Menge von Chlorophyll war also offenbar gänzlich vom Petroläther aufgenommen worden<sup>1)</sup>. Die später hergestellten Extrakte von Nr. 5 und 6

<sup>1)</sup> Nach Tswett (10) nimmt Petroläther außer dem Karotin auch Spuren der anderen Farbstoffe auf. Ferner habe ich den Fehler begangen, die Objekte 1—4 (ob auch 5—6, habe ich nicht notiert) vor dem Trocknen in Wasser auszukochen, wodurch die übrigen Plastidenfarbstoffe durch Petroläther extrahierbar werden sollen.



verhielten sich hierin anders; während das Petroläther-Extrakt von Nr. 6 (Nr. 5 ging verloren) keine Spur von Chlorophyll enthielt, gaben die Alkoholextrakte ein recht starkes und scharfes Chlorophyllband I; das war auch zu erwarten, da beide Objekte auch mikroskopisch chlorophyllhaltig sind.

Das Ergebnis dieser Versuche läßt sich so formulieren: Alle untersuchten Objekte enthalten reichlich ein Karotin, daneben aber noch mehr oder weniger reichlich einen zweiten, durch alkoholfreien Petroläther nicht extrahierbaren gelben Farbstoff, welcher vielleicht bei allen derselbe ist. Außerdem enthalten alle Objekte etwas Chlorophyll, selbst diejenigen, in denen es sich mikroskopisch nicht nachweisen ließ, diese freilich nur in Spuren. Damit wird zugleich bestätigt, daß der im Stroma vieler Chromoplasten und der Intermediärplastiden vorhandene grüne Farbstoff Chlorophyll ist.

#### VI. Entwicklungsgeschichte.

Viele meiner Objekte hatte ich Gelegenheit, auch in mehr oder weniger jungen Zuständen zu untersuchen und so Erfahrungen über die Entwicklung der Plastiden zu sammeln. Bevor ich aber hierzu übergehe, will ich zunächst die Fälle besprechen, in denen Chromoplasten erst in älteren Organen (einige Zeit nach deren Auswachsen) auftreten, oder doch deren Ausbildung auch nach dem Auswachsen des Organs noch fortschreitet.

Als ein extremer Fall ist *Smilax* (42) zu nennen, wo die ausgewachsenen oberen Internodien grün, die Internodien des unteren Stammteils hingegen gelb sind und in allen ihren Teilen typische Chromoplasten enthalten; ob die Umbildung der Plastiden nicht vielleicht schon früher beginnt, indem etwa die Chloroplasten in den grünen oberen Internodien schon gelbe Grana führen, habe ich zu untersuchen versäumt. Bei der grünen Form von *Selaginella proniiflora* (10) sind nur die älteren Teile rötlich. Bei *Desmoncus* (37) sind die zu Haken umgebildeten oberen Blattfiedern an kürzlich ausgewachsenen Blättern noch grün, färben sich aber allmählich gelb. Bei der Palme *Chrysalidocarpus lutescens* sind der Blattstiel, die Rhachis, die Schwellpolster der Fiedern und der untere Teil ihrer Mittelrippe am kürzlich entfalteten Blatt blaßgelb; bald färben sich aber diese Teile hochgelb, und ältere Blätter



werden in ihrer ganzen Ausdehnung intensiv gelb. Bei *Vanda* (61) finden sich im kürzlich ausgewachsenen Blatt nur nahe der Spitze Intermediärplastiden, im älteren Blatt sind die Chloroplasten überall durch Auftreten gelber Grana und Schwinden des Chlorophylls zu Chromoplasten umgebildet. Bei *Coelogyne miniata* (58) sind in der jüngeren Lamina nur die Nerven braun (von Intermediärplastiden in der Strangscheide); bei älteren Blättern bräunt sich die Lamina oft in ihrer ganzen Ausdehnung. Unter den Dikotylen finden wir ähnliche Beispiele im Blattstiel von *Albertisia* (72) und *Landolphia* (94).

Fälle, wo Chromoplasten sich erst in höherem Alter des Organs ausbilden, dürften häufiger sein, doch habe ich sie im allgemeinen nicht berücksichtigt, weil sie schwer von der dem Absterben vorausgehenden Altersvergilbung abzugrenzen sind, welche nicht mehr in den Rahmen meiner Untersuchung gehörte; in den oben angeführten Beispielen handelt es sich wohl durchgängig um Organe, die noch lange nicht dem Absterben nahe waren.

Ein eigenartiges Verhalten zeigt der Stamm von *Vanilla Walckeriae* (60). Hier erscheinen die kürzlich ausgewachsenen Internodien (*a*) grün, obwohl ihre Plastiden schon Grana enthalten. In älteren Internodien (*b*) hat die Zahl der Grana zwar zugenommen, noch mehr aber der Chlorophyllgehalt des Stromas, so daß die äußere Färbung des Organs reiner grün geworden ist. In den unteren Stengelteilen (*c*) ist aber die Lichtseite tief rotbraun geworden, und man findet die ursprünglichen Leuko-Chromoplasten der peripherischen Zellschichten zu typischen Chromoplasten umgebildet, im übrigen Gewebe die Grana vermehrt und das Stroma verblaßt; an der Schattenseite hingegen haben sich fast alle Plastiden zu reinen Chloroplasten umgebildet. Bei diesem Objekt geht die Entwicklung der Plastiden gleichzeitig in entgegengesetzten Richtungen vor sich, teils an verschiedenen Seiten desselben Internodiums (*c*), teils (*b*) am selben Ort und sogar bei denselben Plastiden, deren Chromoplasten- und Chloroplastenmerkmale gleichzeitig zunehmen; dieses letztere ist ein ganz exceptionelles Verhalten.

An die obigen Fälle schließen sich solche an, in denen die noch wachsenden Organe Chloroplasten oder Leukoplasten enthalten, die sich erst beim Auswachsen zu Intermediärplastiden oder typischen Chromoplasten ausbilden. Ein gutes Beispiel hiefür bieten die Blätter von *Ficus* (68, *B*, *b—d*), bei denen ich festgestellt habe, daß



die Umwandlung der Chloroplasten in Intermediärplastiden resp. Chromoplasten erst nach Erreichung der vollen Größe des Blattes und vollständiger Ausbildung der Stomata beginnt; nur in dem Epithem der Hydathoden sind zu dieser Zeit die Chromoplasten (die hier wohl aus Leukoplasten entstehen) schon vorhanden, erreichen aber erst später ihre endgiltige intensive Farbe.—Bei *Dischidia Gaudichaudii* (98) sind die jungen Internodien grün, die jungen Haftwurzeln farblos, während im erwachsenen Zustande beide von Chromoplasten gelb sind. — Im Blattstiel von *Vanilla africana* (59) enthält in der Jugend die Epidermis Leukoplasten, das zentrale Gewebe blasse Chloroplasten, welche beide im erwachsenen Organ zu Chromoplasten geworden sind; die peripherische Rinde führt schon in der Jugend Intermediärplastiden, in denen aber beim Auswachsen die Menge der Grana zunimmt—Als weitere Beispiele seien noch genannt die Knollen von *Dendrochilum aurantiacum*, die Rankenspitze des Blattstieles von *Flagellaria* (41), der Blattstiel von *Trichosanthes* (103) und die Internodien und Blattstiele einer unbestimmten Lauracee (73); alle diese enthalten in der Jugend Chloroplasten, welche im erwachsenen Organ bei den drei ersten zu Chromoplasten, bei der letztgenannten zu Intermediärplastiden werden.

Ebenso häufig kommt es vor, daß die Plastiden schon vor dem Auswachsen des Organs den Charakter von Chromoplasten annehmen, resp. bis zum definitiven Grade steigern. Ein paar Beispiele mögen genügen. Bei den roten Exemplaren von *Selaginella proniiflora* und *pallidissima* (10, 14) sind nur die jüngeren Blätter an den wachsenden Spitzen der Laubzweige grün und enthalten reine Chloroplasten. Bei *Selaginella spec.* (11) ist der Vegetationspunkt der Zweige farblos, die jungen Blätter und Stengelpartieen führen reine Chromoplasten, welche sich hier also aus Leukoplasten entwickeln (später bilden sie sich durch Produktion von Chlorophyll im Stroma zu braunen Intermediärplastiden um). Bei *Liparis* (51) sind die jungen Niederblätter bräunlich, mit Intermediärplastiden, welche später zu orangen Chromoplasten werden.

Es gibt weiter Fälle, wo sowohl im erwachsenen wie im noch jungen Organ Chromoplasten gefunden werden, wo also die Plastiden im Laufe der Entwicklung keine wesentliche Änderung erleiden. Solche sind: die Blattscheide von *Grammatophyllum* (55), die Blattstiele von *Picrodendron* (84), das peripherische Gewebe im



Blattstiel von *Fagraea litoralis* (91). Die jüngsten Entwicklungsstadien habe ich in diesen Fällen freilich nicht untersucht.

Damit ist aber die Skala der in der Natur realisierten Möglichkeiten noch nicht erschöpft. Zu meiner anfänglich nicht geringen Überraschung fand ich vielmehr, daß Chromoplasten oder wenigstens Intermediärplastiden auch das Primäre sein und mit fortschreitender Entwicklung sich mehr oder weniger vollständig in Chloroplasten umbilden können. Ja dies ist vielleicht sogar das häufigste Verhalten. Da es neu und bemerkenswert ist, will ich die hierhergehörigen Fälle etwas eingehender besprechen als die bisherigen. Diejenigen Objekte, bei denen im erwachsenen Zustand die Grana vollständig schwinden, sind durch ein \* hervorgehoben.

Bei \**Selaginella laevigata* (7 B, e) sind die Laubsprosse rein grün, aber die Endknospen ihrer Zweige kupferbraun; die jungen Blättchen führen Intermediärplastiden. Die Entwicklung der Plastiden ist also hier gerade entgegengesetzt wie bei einigen anderen, oben besprochenen Spezies.

Daß bei *Selaginella spec.* (11) die ursprünglich aus Leukoplasten entstandenen reinen Chromoplasten nachträglich durch Ausbildung von Chlorophyll im Stroma zu Intermediärplastiden werden, ist oben schon erwähnt worden.

Bei \**Encephalartos* (15) finden sich in den jungen Fiederblättchen Plastiden von überwiegendem Chromoplasten-Charakter; in soeben ausgewachsenen sind die Plastiden bedeutend grüner geworden, die Grana sind aber noch nicht geschwunden, obwohl sie anscheinend abgenommen haben. In vorjährigen Blättern endlich finden sich nur noch reine Chloroplasten.

Bei allen untersuchten *Gnetum*-Arten enthalten die Blattorgane, manchmal auch die Internodien, in der Jugend Chromoplasten oder wenigstens rotbraune Intermediärplastiden; während der weiteren Entwicklung tritt aber der Chromoplasten-Charakter je nach der Spezies oder dem Organ teilweise oder vollständig zurück. Bei *G. funiculare* (24) z. B. bleiben in den Internodien der Langtriebe die Grana in den ergrüntten Plastiden größtenteils lange, vielleicht dauernd erhalten; das \*Mesophyll der ausgewachsenen Lamina enthält hingegen nur reine Chloroplasten, während ihre \*Mittelrippe allmählich fast farblos (schwach gelblich) wird, hier muß also eine Umwandlung der Chromoplasten in Leukoplasten stattfinden.

Bei *Freycinetia* (28): In Stamm, Luftwurzel und Blattbasis nehmen



die in der Jugend vorhandenen Intermediärplastiden beim Auswachsen überwiegenden Chloroplasten-Charakter an; die Grana nehmen vielleicht absolut nicht ab, aber treten infolge des Wachstums der Plastiden und der Ergrünung ihres Stromas relativ bedeutend zurück. In der \**Lamina* findet eine Umbildung zu reinen Chloroplasten statt.

*Liparis* (51): Die Luftwurzel enthält überall Intermediärplastiden, welche aber in der Spitze am stärksten rot sind; die Entwicklung der Plastiden erfolgt also hier in umgekehrter Richtung wie in den früher erwähnten Niederblättern derselben Pflanze.

Die Luftwurzel von *Coelogyne Rochussenii* (54) verhält sich ähnlich, doch enthält die Spitze reine rote Chromoplasten; das ist bemerkenswert als der einzige Fall, in welchem ich reine Chromoplasten schon im Vegetationspunkt konstatiert habe.

\**Dendrobium spec.*: die jungen Knollen enthalten Intermediärplastiden, die älteren reine Chloroplasten.

*Pholidota imbricata* (58, a, b): Das ganze Mesophyll der jungen *Lamina* führt Intermediärplastiden; beim Auswachsen nimmt überall der Chlorophyllgehalt der Plastiden zu, und in den \*inneren Schichten schwinden überdies die Grana gänzlich.

Bei *Vanilla Walkeriae* (60) sind die noch wachsenden Internodien des Stammes braun, enthalten also zweifellos Intermediärplastiden von überwiegendem Chromoplasten-Charakter, während beim Auswachsen die Internodien grün werden. Da, wie schon oben erwähnt wurde, an alten Internodien wieder eine Neubildung von Granis stattfindet, so schlägt also bei diesem Objekt die Richtung der Entwicklung der Plastiden mit der Zeit in die entgegengesetzte um.

\**Roydsia* (75): *Lamina*, Blattstiel und Internodien führen in der Jugend Intermediärplastiden, welche später überall (zuweilen mit Ausnahme des Blattstiels) in reine Chloroplasten übergehen; in der *Lamina* geschieht das schon während des Wachstums, in den Internodien etwa beim Auswachsen, im Blattstiel erst im erwachsenen Zustande.

*Xanthophyllum* (85) ist ein bemerkenswertes Objekt, dem man für gewöhnlich keine Chromoplasten zumuten würde. Nur an den austreibenden Zweigen sind die wachsenden Internodien, Blattstiele und Mittelrippe des Blattes hochgelb, mit mehr oder weniger reinen Chromoplasten. Beim Auswachsen der Organe ergrünen die Plastiden, doch bleiben gelbe Grana in ihnen erhalten.



*Hippocratea* (87) verhält sich ähnlich, nur ist hier in der Jugend auch die Lamina gelb, und die gelbe Färbung bleibt in Blattstiel und Mittelrippe lange, stellenweise dauernd erhalten. Ob hier in den ergrünenden Partien die Grana der Plastiden persistieren oder schwinden, konnte ich nicht untersuchen.

Mehrfach wurde beobachtet, daß die Entwicklung der Plastiden in verschiedenen Teilen oder Regionen eines Organs in entgegengesetztem Sinn verläuft. Ein solcher Fall (Licht- und Schattenseite des unteren Stengelteils von *Vanilla Walkeriae*) ist schon oben bei Gelegenheit angeführt worden; hier möchte ich noch einige weitere Beispiele besprechen.

Die jungen Internodien von *Gonocaryum fuscum* (88) sind oberseits gelblich, mit Intermediärplastiden von vorwiegendem Chromoplasten-Charakter, unterseits grünlich, mit fast reinen Chloroplasten. Die erwachsenen Zweige hingegen sind bräunlich, oberseits mit grünem, unterseits mit gelbem Ton; die Plastiden der Oberseite haben ein stark grünes Stroma und enthalten relativ wenige, sehr kleine, gelbe Grana, hier hat also der Chlorophyllgehalt zugenommen, während die Grana abgenommen haben; unterseits sind die Grana zahlreicher, das Stroma nur blaßgrün, — also Zunahme, resp. Neubildung der Grana und Abnahme des Chlorophyllgehaltes.

Bei *Brexia serrata* (76 A, a, d) enthält in der jungen Lamina das ganze Mesophyll Intermediärplastiden mit kleinen Granis. Während der weiteren Entwicklung findet eine Differenzierung derart statt, daß die Plastiden der inneren Mesophyllschichten sich zu reinen Chromoplasten mit bedeutend größeren Granis umbilden, diejenigen mehrerer peripherischer Schichten hingegen zu reinen Chloroplasten werden. Im Blattstiel dieses Objektes (b, d) entwickeln sich die Plastiden der Ober- und Unterseite ebenfalls in verschiedenem Sinne.

Bei *Olax* (70) sind im jungen Zustand alle Organe nahezu gleichfarbig hellbraun und enthalten wenig differenzierte Intermediärplastiden. Später erfolgt eine Differenzierung, indem in der Rinde der Internodien der Chlorophyllgehalt der Plastiden zunimmt ohne daß die Grana ganz schwinden, im Blattstiel und Mittelnerv des Blattes die Grana erheblich zunehmen, während das Stroma mehr oder weniger verblaßt, im Mesophyll der Lamina endlich das Stroma stark ergrünt, die Grana entweder vollkommen schwinden oder (in



den obersten Zellschichten besonnener Blätter) wenigstens stark reduziert werden.

Wenn wir das in diesem Kapitel mitgeteilte Tatsachenmaterial überblicken, so sehen wir, daß die Chromoplasten (mit Einschluß der Intermediärplastiden) sich, wie in mancher anderer Hinsicht, so auch bezüglich ihrer Entwicklung je nach der Spezies und den Organen außerordentlich verschieden verhalten. Sie können das Endprodukt, aber auch den Ausgangspunkt der mannigfachen Metamorphosen sein, welche die Plastiden durchmachen; sie können aus Leukoplasten oder Chloroplasten entstehen, sie vermögen sich aber auch zu Chloroplasten oder (ausnahmsweise) zu Leukoplasten umzubilden.

Bei allen den besprochenen Entwicklungsvorgängen fällt es auf, daß (mit ganz vereinzelt Ausnahmen) die Bildung resp. Zunahme der Grana, also des Karotins, mit einer Abnahme oder vollständigem Schwinden des Chlorophylls verbunden ist, und umgekehrt. Unwillkürlich drängt sich der Gedanke auf, ob nicht der eine Stoff auf Kosten des anderen gebildet wird, resp. das Material zu dessen Bildung liefert. Es braucht wohl kaum betont zu werden, daß die erwähnten Tatsachen für diesen Schluß keinesfalls beweisend sein können; aber ebenso ungerechtfertigt wäre es, die obige Annahme a limine zu verwerfen; denn so verschieden auch die chemische Zusammensetzung von Karotin und Chlorophyll ist, so ist es doch a priori keineswegs unmöglich, daß ersteres als N-freies Material zum Aufbau des letzteren dienen könnte, und ebenso, daß die N-freien Zerfallsprodukte des Chlorophylls das Material zur Bildung des Karotins hergeben könnten.

#### VII. Äußere Beeinflussungen.

Pathologische Verfärbungen beabsichtigte ich im allgemeinen nicht zu berücksichtigen. Doch habe ich immerhin einige Fälle untersucht, wo die Ausbildung von Chromoplasten augenscheinlich durch pathologische Eingriffe bedingt ist.

Bei *Fagraea imperialis* (93), bei der sonst alle Organe rein grün sind, finden sich in den Blättern unregelmäßig verteilte, gelbe Flecke, in denen das Blattgewebe in seiner ganzen Dicke typische Chromoplasten führt. Das Gewebe ist lebend, aber stellenweise pathologisch verändert, ohne daß die Ursache der Veränderung ersichtlich wäre.



Bei den *Agathis*- (*Dammara*-) Arten (19 c, 20 c) finden sich ebenfalls in der Blattlamina rote, chromoplastenführende Flecke, allem Anschein nach durch lokale Verletzungen hervorgerufen, da in ihrem Zentrum das Gewebe abgestorben und gebräunt ist. Hier liegt es sehr nahe anzunehmen, daß eben die Verletzung resp. das lokale Absterben die Veranlassung zur Umbildung der Chloroplasten des umliegenden Gewebes in Chromoplasten gewesen ist. Allerdings finden sich bei diesen Pflanzen in den Zweigen (*d*) ebenfalls rote Flecke, die nichts Pathologisches aufweisen.

Während in diesen Fällen der äußere Anlaß der lokalen Chromoplastenbildung jedenfalls unklar ist, so ist er hingegen in dem Fall von *Heligme* (95) sehr deutlich. An den Blättern dieser Pflanze fand ich begrenzte gelbe, chromoplastenführende Flecke ausschließlich und ausnahmslos um die an ihnen sitzenden Schildläuse, deren Stich also die erste Veranlassung zur Umbildung der Plastiden geboten haben muß. Nach weiteren derartigen Fällen habe ich vergeblich gesucht; Schildläuse auf Pflanzen sah ich zwar häufig, aber sie bewirkten keine Chromoplastenbildung. Äußerlich ziemlich ähnliche Flecke sah ich um die Uredo-Lager eines Rostpilzes bei *Odina gummifera* im Buitenzoger Garten; die Färbung war hier aber nur durch tiefgelbe Tropfen in den Pilzhyphen verursacht.

Dagegen fand ich eine sehr merkwürdige Beziehung der Chromoplastenbildung zu dem Mykorrhiza-Pilz in den Luftwurzeln mehrerer epiphytischer Orchideen, nämlich *Rhynchosstylis retusa* (62), *Aërides odoratum* (63), *Arachnanthe moschifera* (64), *Vanda teres* (61), *Vanda spec.* und *Renanthera Arachnites*; alle diese Gattungen sind nahe verwandt (sie gehören zu den *Sarcanthinae-Aërideae*) und zeichnen sich durch sehr dicke Luftwurzeln aus. Am auffallendsten tritt die Beziehung bei *Rhynchosstylis* auf, zumal sich hier Chromoplasten ausschließlich an den Stellen finden, welche den Pilz beherbergen (sowohl in den pilzführenden Zellen selbst, wie in den umliegenden pilzfreien Zellschichten); bei mehreren der anderen Objekte sind Chromoplasten oder Intermediärplastiden auch sonst in der Luftwurzel vorhanden, aber in den Mykorrhiza-Stellen am typischsten ausgebildet. Bezüglich des Näheren sei auf den Speziellen Teil verwiesen. — Bei den in ziemlicher Zahl untersuchten Orchideen mit dünnen Luftwurzeln habe ich keine Beziehung zwischen Mykorrhiza-Pilz und Chromoplasten bemerkt; ich habe freilich meist auch nicht darauf geachtet, da ich



erst relativ spät auf die Erscheinung aufmerksam wurde; sie wäre aber nicht leicht zu übersehen. Bei zwei unbestimmt gebliebenen Orchideen habe ich den Mangel einer solchen Beziehung ausdrücklich festgestellt; bei der einen waren kleine, orange Chromoplasten in der ganzen Rinde der Luftwurzel zerstreut, und an deren Unterseite, wo sich der Pilz befand, nicht stärker, eher schwächer ausgebildet als anderwärts; die andere enthielt viel Mykorrhiza-Pilz, aber überall nur Chloroplasten.

Sehr verbreitet und oft augenfällig ist die Abhängigkeit der Chromoplastenbildung vom Licht<sup>1)</sup>. Dieselbe kann sich erstens darin äußern, daß der Chromoplasten-Charakter der Plastiden an der Lichtseite der Organe stärker und reiner ausgeprägt ist als an der Schattenseite, oder daß (bei den im folgenden mit \* bezeichneten Objekten) nur an der stärker beleuchteten Seite Chromoplasten oder Intermediärplastiden vorhanden sind. Als Beispiele können dienen: *Marsilia spec.* (2), Blättchengelenke; \**Lycopodium* (5), Blätter; *Araucaria* (21) und *Cryptomeia* (22). Hauptstamm und Zweige; die schon in Kap. VI besprochenen unteren Internodien des Stammes von *Vanilla Walkeriae* (60); die \*Blattscheiden von *Dendrobium subulatum*; die Blätter der *Haworthia*-Arten (43); die Stengel von *Cassytha* (74), *Croton* (86), *Dischidia albida* (96); die Blattstiele der *Agathis*-Arten (19, 20), der meisten *Gnetum*-Arten (25—27), der *Gonocaryum*-Arten (88) und vieler anderer Pflanzen; die Kannen von *Dischidia Rafflesiana* (97); das Gelenk von \**Actoplanes* (49). Bei manchen dieser Objekte ist die stärker beleuchtete Seite zugleich die morphologische Oberseite, und in solchen Fällen kann es zweifelhaft sein, ob der Unterschied in der Aus-

<sup>1)</sup> Diese Abhängigkeit ist für die winterliche Verfärbung der Koniferen (Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten, wie es Schimper bezeichnet) schon lange bekannt; vgl. die Literatur bei Schimper (8, S. 166 ff.). Einen weiteren Fall hat Schimper bei *Hartwegia comosa* aufgefunden, den er selbst freilich nicht hieher zu rechnen scheint; es handelt sich hier um Bildung von Intermediärplastiden aus reinen Chloroplasten am Sonnenlicht (vgl. den Speziellen Teil, am Schluß der *Liliaceae*).

Molisch (7) hat bei vielen *Aloë*-Arten sowie einigen (aber nicht allen) Arten von *Selaginella* durch längere Besonnung die Umwandlung von Chloroplasten in Chromoplasten und durch längere Verdunklung den umgekehrten Vorgang hervorrufen können. Auch Gentner (3) betont die Notwendigkeit der Besonnung für die Rotfärbung der Selaginellen. Nach meinen Erfahrungen kann das aber bei *Selaginella*-Arten nur bedingte Giltigkeit haben.



bildung der Plastiden dem Licht oder nur der dorsiventralen Struktur zuzuschreiben ist; doch ist selbst bei dorsiventralen Organen ein solcher Zweifel häufig genug ausgeschlossen, wenn nämlich deren stärker oder allein gefärbte Oberseite nicht ganz oder nicht in ihrer ganzen Ausdehnung mit der morphologischen Oberseite zusammenfällt.

Ein besonders instruktives Beispiel liefern die Blätter von \**Lycaste* (50, a, b). Solange das junge Blatt noch zusammengefaltet und aufrecht, seine morphologische Unterseite also die allein beleuchtete ist, finden sich Chromoplasten nur hier in einigen peripherischen Zellschichten; wenn aber die auswachsende Lamina sich entfaltet, erscheinen Chromoplasten in den peripherischen Zellschichten der Oberseite, während sie an der Unterseite zurückgehen. Die Entwicklung der Plastiden erfolgt also an den beiden Flächen des Blattes in entgegengesetztem Sinne, in beiden aber so, daß die Chromoplasten sich auf die stärker beleuchtete Fläche beschränken.

Andererseits kann sich der Einfluß des Lichtes darin zeigen, daß die Chromoplasten (im weiteren Sinne) sich nur an hinreichend beleuchteten Exemplaren oder Partien der Pflanze ausbilden, oder doch hier stärker als im Schatten. Bei *Olax* (70) sind alle Organe an besonnten Stellen stärker rot resp. braun gefärbt als im Schatten, und die Blattlamina ist nur an der Sonne bräunlich, im Schatten rein grün. Bei *Gnetum funiculare* (24) bleibt an stark beschatteten Zweigen die charakteristische rotbraune Färbung aller Organe aus. Interessant ist das Verhalten der braunen Form von *Selaginella spec.* (9); hier sind, obwohl die Pflanze an recht schattigen Stellen wächst, die Blätter von Intermediärplastiden braun, aber der Innenrand des einen Dorsalblattes jedes Paares, welcher von dem anderen Dorsalblatt bedeckt wird, ist grün; das zeigt, daß die Bildung der roten Grana, wenn sie auch nur wenig Licht erfordert, doch an ein gewisses Minimum von Licht gebunden ist. Bei stark roten Exemplaren von *Selaginella fimbriata* (8, d) waren an den im relativ schwachen Licht des Laboratoriums hinzugewachsenen Partien die Zweige farblos (ganz frei von Chromoplasten), die Blätter mit Ausnahme gewisser Partien grün. Endlich ist *Selaginella pallidissima* (14) im Schatten ganz grün, an der Sonne in allen erwachsenen Teilen rot.

Es wäre aber verfehlt, diese Erfahrungen über den Einfluß des Lichtes verallgemeinern zu wollen. Dem steht erstens eine Anzahl



von Fällen gegenüber, wo sich Chromoplasten in ganz verdunkelten oder doch kaum dem Licht zugänglichen Organen oder Organteilen finden. In nenne die im Humus verborgenen Wurzeln von *Lycopodium* (5) und *Hoya lacunosa* (99), das unterirdische Rhizom von *Selaginella amoena* (12), und als ein weniger extremes Beispiel die Innenseite der Blattscheide von *Grammatophyllum* (55). Zweitens gibt es eine ganze Reihe von Fällen, wo trotz ausgeprägt einseitiger oder lokal verschiedener Beleuchtung sich keine Verschiedenheit in der Ausbildung von Chromoplasten zeigt. So sind bei *Selaginella amoena* (12) die Chromoplasten an der Innenseite der dem Stengel ausgepreßten Blätter ebenso beschaffen wie an der Außenseite; in der Epidermis der Knolle von *Pholidota articulata* (56) zeigt sich kein Unterschied zwischen den freien und den von angepreßten Niederblättern bedeckten Stellen; in den kriechenden Stengeln und den Haftwurzeln von *Dischidia Gaudichaudii* (98) ist die Lichtseite und Schattenseite gleich intensiv gelb. und es macht auch keinen Unterschied, ob die Pflanze an sonniger oder beschatteter Stelle wächst.

Endlich kommt es auch recht häufig vor, daß die Chromoplasten an der Schattenseite der Organe stärker entwickelt sind als an der Lichtseite, oder selbst nur an der Schattenseite vorhanden sind (Fälle der letzteren Art sind in den folgenden Beispielen mit \* bezeichnet). In der Lamina des \*Schwimmblattes von *Marsilia quadrifolia* (3) finden sich Chromoplasten nur in den äußersten Zellschichten der Unterseite. In den roten Blättern von *Selaginella pruriiflora* (10) fand ich die Chromoplasten an der Unterseite dunkler rot gefärbt als an der Oberseite. Bei der Bambusee *Ochlandra stridula* ist der Blattstiel, besonders unterseits grell gelb. Bei *Vanilla spec.* führt der Blattstiel an der Unterseite fast reine Chromoplasten, an der Oberseite Intermediärplastiden mit stark grünem Stroma. Bei \**Ficus diversifolia* (68) enthält das Schwammparenchym der Blattunterseite Chromoplasten, das Palissadenparenchym der Oberseite reine Chloroplasten. Bei *Gonocaryum* (88) ist die Mittelrippe des Blattes unterseits in viel längerer Ausdehnung gelb als oberseits, und die Zweige sind unterseits gelblich-, oberseits grünlichbraun, mit entsprechend verschiedener Ausbildung der Plastiden. Ähnlich bevorzugt ist die Unterseite an Blattstiel und Mittelrippe von *Hippocratea* (87). Bei *Fagraea monantha* (92) sind die Chromoplasten im Blattstiel an der Unterseite reichlicher, in



der \*Lamina nur an der Unterseite vorhanden, und die Umgebung der unterseitigen Nektarien ist an Chromoplasten bedeutend reicher als die der oberseitigen. Bei *Cymbidium spec.* enthalten die angehefteten Luftwurzeln an der Schattenseite gelbe Chromoplasten, an der Lichtseite grünelbe Intermediärplastiden. Lehrreich ist das Verhalten von *Cassia alata* (80), wo am Hauptgelenk und der Rachis die Oberseite, an den Blättchengelenken aber die Unterseite viel stärker gefärbt ist. — Außerdem könnten hier auch die zahlreichen, in Kap. III. besprochenen Fälle angeführt werden, wo das Chromoplasten-Maximum sich nicht in den besser durchleuchteten äußeren, sondern in den mittleren oder inneren Gewebeschichten befindet.

Wir sehen also, daß das Licht zwar in vielen Fällen die Ausbildung von Chromoplasten fördert oder sogar bedingt, bei zahlreichen anderen Objekten aber keine Rolle spielt<sup>1)</sup>.

Außer dem Einfluß des Lichts könnte ferner ein Einfluß des Wassermangels resp. verstärkter Transpiration in Betracht kommen. Ein Obergärtner in Kew versicherte mir, er könne alle Aloineen durch Trockenhalten zur Rotfärbung ihrer Blätter veranlassen (welche hier, wie N. 43–47 zeigen, auf Chromoplastenbildung beruht<sup>2)</sup>). Bei der großen Mehrzahl meiner Objekte, welche in den feuchtheißen Tropen wuchsen, kommt nun Trockenheit allerdings nicht in Betracht. Wohl aber wäre es möglich, daß der in Kap. III. besprochene Einfluß der Spaltöffnungen darauf zurückzuführen ist, daß die direkt an die Atemhöhlen grenzenden Zellen stärker transpirieren als die übrigen und daher relativ weniger wasserreich sind; falls dies zutrifft, so wäre indeß der Einfluß dieses Faktors nicht nur nicht durchgreifend, sondern sogar in verschiedenen Fällen entgegengesetzt. Möglich wäre es ferner, daß auch der fördernde Einfluß des Lichtes auf die Ausbildung von Chromoplasten auf eine Steigerung der Transpiration zurückzuführen ist.

<sup>1)</sup> Auch in den Blüten und Früchten ist die Ausbildung der Chromoplasten vom Licht unabhängig; siehe darüber Schimper (8, S. 162).

<sup>2)</sup> Gentner (3) behauptet, daß bei den von ihm untersuchten *Selaginella*-Arten (unter denen sich auch *S. laevigata* befindet) zur Rötung grüner Sprosse Sonnenlicht mit Trockenheit zusammenwirken müsse. Ich habe aber *Selaginella laevigata* sowohl im feuchtschattigen Urwald bei Buitenzorg, wie auch im Farnhaus in Kew, wo es ebenfalls weder sonnig noch trocken zu sein pflegt, mit roten Stengeln und Wurzelträgern gefunden.



Wenn wir nun das zusammenfassen, was wir über die Bedingungen der Bildung von Chromoplasten in vegetativen Organen wissen, so ist klar, daß eine allgemeine und greifbare Ursache dieser Erscheinung sich nicht feststellen läßt. Die erörterten äußeren Faktoren können die Erscheinung beeinflussen, können aber auch ohne Einfluß auf sie sein; und wo ein Einfluß vorhanden ist, kann derselbe seinem Sinn nach wechseln. Das gleiche gilt auch von den der Untersuchung zugänglichen inneren Faktoren, wie systematische Stellung, morphologische Natur der Organe, Natur der Gewebe und Zellen und Lage derselben im Organ, endlich von dem Alter (Entwicklungsstadium). Man kann allgemein nur sagen, daß die Ursache der Chromoplastenbildung in gewissen, uns noch ganz unverständlichen spezifischen und lokalen Befähigungen beruhen muß, deren Realisation von einer Reihe von Faktoren, inneren wie äußeren, abhängig sein resp. quantitativ beeinflußt werden kann. Zu den inneren Faktoren gehören, außer den soeben genannten, z. B. die besonderen Bedingungen, welche im Drüsengewebe (Nektarien, Hydathoden) gegeben sind, ferner diejenigen, durch welche sich die morphologisch oberen Blätter eines Triebes von den übrigen, oder die bei *Brexia serrata* aus der Stammbasis hervorbrechenden Schößlinge sich von den Zweigen der Krone unterscheiden. Zu den äußeren Faktoren, deren Mitwirkung notwendig oder förderlich sein kann, aber nicht immer zu sein braucht, gehören häufig ein gewisses Ausmaß von Licht, vielleicht auch der Transpiration, manchmal auch pathologische Eingriffe verschiedener Art, zu denen auch der Einfluß von Symbionten (Mykorrhiza-Pilz) gerechnet werden kann.

#### VIII. Die Funktion der Chromoplasten.

Wir haben festgestellt (Kap. IV), daß die Chromoplasten sehr häufig Stärke zu bilden vermögen<sup>1)</sup>, und zwar in eventuell reichlichem Maße; vielleicht haben sie diese Fähigkeit stets, obwohl sie begrifflicherweise nicht immer in die Erscheinung tritt. Das ist

<sup>1)</sup> Das hat schon Schimper (8, S. 106) angegeben, welcher dabei wohl nur die Wurzel von *Daucus Carota* und allenfalls noch chlorophyllfreie Saprophyten im Auge gehabt haben kann. Später hat Winkler (12) nachgewiesen, daß auch die Chromoplasten der Blüten und Früchte oft Stärke aus dargebotenem Zucker zu bilden vermögen.



auch keineswegs überraschend, ja so gut wie selbstverständlich, da ja die Chromoplasten ein plasmatisches Stroma haben und sich von den Leukoplasten nur durch die Anwesenheit der eingeschlossenen Grana (ja zuweilen nur durch die Farbe derselben, worüber weiter unten) unterscheiden. Allerdings dürfte in den Fällen, wo die Chromoplasten ganz von sehr dicht gelagerten Granis ausgefüllt erscheinen, die Masse ihres Stromas und damit dessen Fähigkeit zur Stärkebildung nicht unwesentlich vermindert sein.

Ebenso selbstverständlich ist es wohl, daß da, wo das Stroma der Chromoplasten einen merklichen Chlorophyllgehalt aufweist, auch die Fähigkeit zur Photosynthese in entsprechendem Grade anzunehmen ist. Da aber mit der Vertretung der Chloroplasten durch Chromoplasten, resp. mit der häufig beobachteten direkten Umwandlung der ersteren in letztere, eine sehr bedeutende Abnahme des Chlorophyllgehalts und sehr oft ein vollständiger Schwund desselben verbunden ist, so dürfte hiebei die Fähigkeit der betr. Organe zur Photosynthese eine wesentliche Einbuße erleiden; man hätte also diese Umwandlung in physiologischer Hinsicht als eine Art Degeneration aufzufassen. Freilich finden sich Chromoplasten in größerer Menge fast nur in für die Photosynthese ohnehin nebensächlichen Organen, wie Stengel, Blattstiele, Blattrippen. — in Blattspreiten dagegen während ihres voll funktionsfähigen Alters nur ausnahmsweise und fast nie in ihrer ganzen Dicke, so daß die Pflanze durch diese Degeneration keine erhebliche Einbuße erleidet; es ist gewissermaßen ein Luxus, den sie sich erlauben kann.

Nun gibt es aber doch Fälle, wo der Ersatz der Chloroplasten durch Chromoplasten in solchem Umfange stattfindet, daß dies für die Kohlenstoffernährung der Pflanze nicht gleichgültig sein kann. So in den Blattstielen der gelben Form von *Cocos* (32) im Vergleich mit ihrer grünen Form; hier mag das freilich noch ziemlich geringe Bedeutung haben. Ferner im Stengel der gelben Form von *Cassytha* (74); das ist zwar ein Parasit, aber bei der grünen Form ist der Stengel so chlorophyllreich, daß die autotrophe Ernährung sicherlich eine nicht zu kleine Rolle spielen muß. Bei dem ganz blattlosen *Viscum angulatum* (69, A) können gerade in den sonst photosynthetisch wirksamsten, flachen Internodien die Chloroplasten gänzlich durch anscheinend vollkommen chlorophyllfreie Chromoplasten vertreten sein. Bei *Dischidia albida* (96) ist, bei der Spärlichkeit, Kleinheit und blassen Färbung der Blätter, der ziemlich



dicke Stengel assimilatorisch wohl gewiß nicht bedeutungslos, wofern er Chlorophyll enthält; nun scheinen aber bei den gelbstengeligen Exemplaren die Chromoplasten eventuell durchweg ganz chlorophyllfrei zu sein. Am weitesten geht aber die Sache bei einigen *Selaginella*-Arten, wo die Rotfärbung unter Umständen auch sämtliche Blätter ergreifen kann; diese sind zwar nie ganz chlorophyllfrei, da sie wenigstens partiell Intermediärplastiden mit merklich grünem Stroma führen; wohl aber muß die Reduktion der Chlorophyllmenge gegenüber grünen Exemplaren eine kolossale sein. — Bei derartigen Objekten drängt sich unwillkürlich die Frage auf, ob die Chromoplasten auch ohne Chlorophyllgehalt nicht doch eine gewisse Befähigung zur Photosynthese haben sollten? Ich muß gestehen, daß ich mich zu dieser Annahme sehr skeptisch verhalte, denn es erscheint mir wenig plausibel, daß ein Farbstoff, welcher nicht das plasmatische Stroma innig durchtränkt, sondern auf mikroskopisch sichtbare, oft relativ grobe Einschlüsse beschränkt ist, photochemisch wirksam sein kann. A limine kann man aber obige Frage doch wohl nicht abweisen, denn experimentell ist die Unfähigkeit lebender Chromoplasten zur Kohlensäurezersetzung meines Wissens nicht genügend sichergestellt<sup>1)</sup>; und selbst wenn sie für Chromoplasten von Blüten oder Früchten sichergestellt wäre, so wäre das noch nicht absolut beweisend für „vegetative“ Chromo-

<sup>1)</sup> In einer mir erst während des Druckes zugänglich gewordenen Arbeit von Josopait („Über die photosynthetische Assimilationstätigkeit einiger chlorophyllfreier Chromatophoren“, Dissertation, Basel, 1900) will der Verf. sogar die Befähigung der Chromoplasten zur Kohlensäurezersetzung in einigen Fällen direkt (mittels der Bakterienmethode) nachgewiesen haben. So namentlich deutlich bei den roten fertilen Sprossen von *Equisetum arvense* (allerdings war die Bewegung und Ansammlung der Bakterien um Schnitte aus dem chromoplastenführenden Teil viel geringer als um solche aus dem grünen Teil in der Nähe der Schilder); in geringerem Grade auch bei *Orobancha spec.* und *Neottia nidus avis*. Dazu muß ich aber bemerken, daß nach meiner Erfahrung die Chromoplasten in roten Sprossen von *Equisetum arvense*, wenigstens zum Teil, nicht chlorophyllfrei sind, wodurch die Beweiskraft des Versuches für diesen Fall vernichtet wird. Negative Resultate erhielt der Verf. mit den Chromoplasten von Blüten (*Tropaeolum majus* u. a.), positive hingegen wieder mit denen junger Wurzeln von *Daucus Carota* und der Früchte von *Solanum Lycopersicum*. Da in beiden letzteren Fällen der Farbstoff in Form von relativ groben Kristallen vorhanden ist, so erscheint mir dieses Ergebnis (falls nicht etwa wieder ein Chlorophyllgehalt des Stromas mitspielt) höchst verdächtig, und ich glaube, daß die ganze Frage in kritischerer Weise nachuntersucht werden müßte.



plasten, welche ja zweifellos lebensfähiger sind als jene. Ich trug mich daher mit der Absicht, obige Frage experimentell zu prüfen. Ausführen konnte ich das leider aus verschiedenen Gründen nicht, von denen der wichtigste die Schwierigkeit ist, ein hierfür ganz geeignetes Objekt zu finden. Es ist nämlich bei den in Betracht kommenden Objekten a priori nur eine schwache Kohlensäurezersetzung zu erwarten, so daß das Ergebnis vielleicht die Fehlergrenzen der Methode nicht oder kaum übersteigen würde, und eine solche geringe Kohlensäurezersetzung könnte vielleicht auf beigemengtes Chlorophyll zurückzuführen sein. Um also in der Beurteilung des Ergebnisses sicher gehen zu können, hielt ich es für erforderlich, erstens mit einem Objekt zu arbeiten, welches nachweislich kein Chlorophyll oder doch nur ganz geringe Spuren davon enthält, und zweitens den Versuch parallel mit einem chromoplastenführenden und einem sonst ganz gleichen, aber grünen Organ auszuführen, um einen Maßstab für die bei dem gegebenen Objekt unter den gegebenen Bedingungen mögliche Größe der  $\text{CO}_2$ -Zersetzung zu haben. Ein diesen Bedingungen genügendes Objekt stand mir aber nicht zur Verfügung. Obgleich ich somit die gestellte Frage offen lassen muß, hielt ich es doch nicht für überflüssig, auf sie wenigstens aufmerksam zu machen<sup>1)</sup>.

In rein physiologischer Hinsicht bringt also die Ausbildung von Chromoplasten in vegetativen Organen der Pflanze im besten Falle keinen oder doch keinen für sie wesentlichen Schaden; von einem Nutzen kann nicht die Rede sein. Ist nun aber vielleicht ein ökologischer Nutzen vorhanden, wie bei den Chromoplasten der Blüten und Früchte? Die gleiche ökologische Funktion, welche den letzteren zugeschrieben wird, nämlich die Anlockung von Tieren, welche der Pflanze irgendwie Dienste leisten, ist bei den Chromoplasten vegetativer Organe wohl vollkommen ausgeschlossen, wenigstens finde ich in keinem einzigen Fall auch die geringsten Anhaltspunkte dafür und ebensowenig für einen etwaigen Schutz gegen Tierfraß. Möglich wäre hingegen ein Schutz des Chlorophylls gegen zu starkes Licht; doch auch daran ist nur in den Fällen zu denken, wo

<sup>1)</sup> Gentner (3) hat dieselbe Frage für seine roten Selaginellen kurzer Hand in positivem Sinne beantwortet, ohne auch nur zu untersuchen, ob denn die roten Plastiden wirklich chlorophyllfrei sind. Ja er versteigt sich sogar zu der Behauptung, daß das Karotin dem Chlorophyll chemisch nahe verwandt sein müsse.



die Ausbildung von Chromoplasten in den peripherischen Geweben durch das Licht bedingt oder begünstigt wird, während die inneren Partien der Organe grün bleiben, nicht aber in denjenigen Fällen, wo Chromoplasten im ganzen Organ gleichmäßig oder vorwiegend in dessen inneren oder sonst schwächer beleuchteten Partien vorhanden sind, ferner wo das Licht sich ohne Einfluß erweist, oder wo Chromoplasten in gar nicht oder sehr schwach beleuchteten Organen vorkommen. In allen diesen Fällen, welche zusammengenommen jedenfalls in der Mehrzahl sind, bringen die „vegetativen“ Chromoplasten, soweit ich sehen kann, auch in indirekter, ökologischer Hinsicht der Pflanze keinerlei Nutzen. Vielleicht werden sie aber gewissen Zweckmäßigkeitsschwärmern Nutzen bringen, indem sie dazu beitragen, ihnen die Augen darüber zu öffnen, daß es in der Pflanzenwelt manche Erscheinungen gibt, welche offenbar keinen „Zweck“ haben und im besten Fall unschädlich sind.

#### IX. Das Verhältnis der Chromoplasten zu den übrigen Plastiden.

Die Chromoplasten nahmen bisher eine gewisse Sonderstellung unter den Plastiden ein, und zwar aus zwei Gründen. Erstens wegen ihrer eng beschränkten Verbreitung (fast ausschließlich in Blüten und Früchten); zweitens, weil man der Ansicht war, daß Chromoplasten zwar aus Leuko- und Chloroplasten hervorgehen, sich aber ihrerseits in andere Arten von Plastiden nicht umzuwandeln vermögen<sup>1)</sup>; sie galten daher als ein Endprodukt der Plastiden-Metamorphose. Nun hat sich erstens herausgestellt, daß Chromoplasten auch in vegetativen Organen recht verbreitet sind. Zweitens habe ich gezeigt (Kap. VI), daß in der Plastiden-Entwicklung Chromoplasten und Intermediärplastiden auch das Primäre sein und sich in Chloroplasten, seltener auch in Leukoplasten umwandeln können; schon in sehr jungen Organen, ja selbst im Vegetationspunkt können sich Chromoplasten als einzige Vertreter der Plastiden vorfinden. Beide Gründe für die Sonderstellung der Chromo-

<sup>1)</sup> Nur ein Fall der Umwandlung von Chromoplasten war bekannt, nämlich die im Frühling stattfindende Rückumwandlung der Chromoplasten der im Winter verfärbten Koniferenblätter in Chloroplasten; dieser etwas eigenartige Fall wurde aber nicht als Ausnahme von der Regel geltend gemacht.



plasten fallen somit fort, und die Chromoplasten erweisen sich als mit den Chloro- und Leukoplasten morphologisch gleichwertig.

Trotz ihrer genetischen und sonstigen Beziehungen zueinander hielt man die drei Arten von Plastiden für im ausgebildeten Zustande scharf voneinander abgegrenzte Gebilde. Als eines der wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung erscheint in meinen Augen der Nachweis, daß eine solche Grenze nicht existiert. In Kap. IV ist gezeigt worden, daß es zwischen den Chloroplasten und Chromoplasten nicht nur keine scharfe, sondern überhaupt keine Grenze gibt; die Intermediärplastiden mit grünem Stroma und farbigen Granis vereinigen die Merkmale beider in annähernd gleichem Maße und sind ihrerseits mit den beiden Extremen (den „reinen“ Chloro- und Chromoplasten) verbunden einerseits durch Chloroplasten mit nur wenigen kleinen Granis, anderseits durch Chromoplasten mit ganz blaß grünlichem Stroma. Bisher war meines Wissens nur ein Fall von derartigen Übergangs-Plastiden bekannt, nämlich die von Schimper (8, S. 163) beobachteten grünen Plastiden mit roten Tröpfchen an der besonnten Seite der Lufwurzeln von *Hartwegia comosa*, ohne daß jedoch Schimper diesen Fall zu allgemeineren Schlüssen verwertet hätte; jetzt sehen wir, daß solche Übergänge relativ recht häufig sind. In demselben Kapitel habe ich ferner darauf hingewiesen, daß auch zwischen Leukoplasten und Chromoplasten alle Übergänge vorkommen. Daß auch kleine, blasse Chloroplasten resp. Leukoplasten mit geringem Chlorophyllgehalt recht verbreitet sind, ist wohl nichts Neues, nur wurde nicht hervorgehoben, daß solche Gebilde Verbindungsglieder zwischen typischen Chloroplasten und typischen Leukoplasten sind. Endlich habe ich Fälle angeführt, in denen die Plastiden die Merkmale aller drei Kategorien (in abgeschwächtem Grade) in sich vereinigen. So bilden denn alle Plastiden auch in ihrem fertig ausgebildeten Zustande eine ununterbrochene Reihe, und die typischen Chloroplasten, Leukoplasten und Chromoplasten sind nur die extremen Endglieder derselben.

Bekanntlich pflegen grüne Pflanzenteile eine gewisse Menge Karotin zu enthalten; und obwohl nicht streng erwiesen, ist es doch höchst wahrscheinlich, daß dieses Karotin neben dem Chlorophyll in den Chloroplasten lokalisiert ist. Andererseits haben wir nun gesehen, daß die Chromoplasten häufig ein wenig Chlorophyll enthalten, und selbst in den Fällen, wo dessen Anwesenheit sich



BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE  
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES.

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES.

DÉRNERS MÉMOIRES PARUS.

(Les titres des Mémoires sont donnés en abrégé).

<b>M. Eiger.</b> Die physiologischen Grundlagen der Elektrokardiographie	Juill. 1911
<b>J. Nowak.</b> Untersuchungen über die Cephalopoden der oberen Kreide in Polen. II. Teil: Die Skaphiten . . . . .	Juill. 1911
<b>J. Markowski.</b> Über die Entwicklung der Sinus durae matris und der Hirnvenen bei menschlichen Embryonen von 15 <sup>o</sup> —49 mm Scheitel-Steißlänge . . . . .	Juill. 1911
<b>Ed. Janczewski.</b> Suppléments à la Monographie des Groseilliers. IV. Hybrides nouveaux . . . . .	Oct. 1911
<b>H. Zapałowicz.</b> Revue critique de la flore de Galicie, XXII parte . . . . .	Oct. 1911
<b>E. Godlewski (sen.).</b> Über anaerobe Eiweißzersetzung und intramolekulare Atmung in den Pflanzen . . . . .	Oct. 1911
<b>A. Beck und G. Bikeles.</b> Über die gegenseitige funktionelle Beeinflussung von Groß- und Kleinhirn . . . . .	Nov. 1911
<b>A. Beck und G. Bikeles.</b> Über die sensorische Funktion des Kleinhirnmittelstücks (Vermis) . . . . .	Nov. 1911
<b>J. Zaczek.</b> Über eine neue Form der Nervenendigungen in den Sinushaaren der Pferde . . . . .	Nov. 1911
<b>L. Popielski.</b> Blutdruck und Ungerinnbarkeit des Blutes bei der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen . . . . .	Nov. 1911
<b>A. Prażmowski.</b> Entwicklungsgeschichte und Morphologie des Azotobacter chroococcum Beijer. Vorläufige Mitteilung . . . . .	Déc. 1911
<b>S. Udziela.</b> Untersuchungen über das Lymphgefäßsystem von Salamanderlarven ( <i>Salamandra maculosa</i> Laur.) . . . . .	Déc. 1911
<b>L. Popielski.</b> Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Aufhebung der Blutgerinnungsfähigkeit für die Tätigkeit der Verdauungsdrüsen . . . . .	Déc. 1911
<b>J. Zajac.</b> Der vertikale Schnitt des monokularen Sehraumes. (Weitere Untersuchungen über das monokulare Sehen) . . . . .	Déc. 1911
<b>K. Białaszewicz.</b> Untersuchungen über die osmotischen Verhältnisse bei der Entwicklung der Frosch- und Hühnerembryonen. Vorläufige Mitteilung . . . . .	Janv. 1912
<b>H. Zapałowicz.</b> Revue critique de la flore de Galicie, XXIII partie	Févr. 1912
<b>K. Kostanecki.</b> Über eigentümliche Degenerationserscheinungen des Keimbläschens . . . . .	Févr. 1912
<b>B. Hryniewiecki.</b> Ein neuer Typus der Spaltöffnungen bei den <i>Saxifragaceen</i> . . . . .	Févr. 1912



## TABLE DES MATIÈRES.

Mars 1912.

	Page
B. HRYNIEWICKI. Ein neuer Typus der Spaltöffnungen bei den <i>Saxifragaceen</i> (Schluß) . . . . .	65
CH. KLECKI. Action de l'émanation du radium sur la phagocytose des microbes . . . . .	74
A. PRAŻMOWSKI. Azotobacter-Studien. I. Morphologie und Cytologie . . . . .	87
J. DUNIN-BORKOWSKI. Versuch einer chemischen Theorie der Hämolyse und der Hämagglutination . . . . .	175
W. ROTHERT. Über Chromoplasten in vegetativen Organen . . . . .	189

---

Le «*Bulletin International*» de l'Académie des Sciences de Cracovie (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries: la première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) contient les travaux qui se rapportent aux Sciences Biologiques. Les abonnements sont annuels et partent de janvier. Prix pour un an (dix numéros): Série A... 8 K; Série B... 10 K.

Les livraisons du «*Bulletin International*» se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à la Librairie «*Spółka Wydawnicza Polska*»  
Rynek Gł., Cracovie (Autriche).

---

Prix 5 K 80 h.

---

---