

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena)

Beiträge zur Cytologie der Blaualgen

II. Mitteilung

Zentroplasma und granuläre Einschlüsse von *Phormidium uncinatum*

Von

G. DREWS und W. NIKLOWITZ

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1955)

In seiner, den eigenen Untersuchungen vorangestellten Literaturübersicht zeigt DRAWERT (1949), daß aus den bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Arbeiten kein einheitliches Bild von der Organisation der Cyanophyceenzelle resultiert. In den folgenden Jahren wurde daher versucht, mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen, der UV-Mikroskopie und dem Phasenkontrastmikroskop neue Erkenntnisse über Anordnung und stoffliche Natur der Zelleinschlüsse zu gewinnen. Übereinstimmend ergibt sich aus diesen, wie auch verschiedenen älteren Arbeiten, daß im Zentroplasma¹ basophile Substanz angeordnet ist, die eine kernähnliche Funktion ausüben soll (BRINGMANN 1950, 1952; BISWAS 1953; HERBST 1953, 1954; v. ZASTROW 1953 und CASSEL u. HUTCHINSON 1954). Nach den Untersuchungen von BRINGMANN, HERBST und v. ZASTROW sind sowohl Desoxyribonucleinsäure² wie auch Ribonucleinsäure³ am Aufbau dieser basophilen Zellbestandteile beteiligt. Auch Volutin (HERBST 1953, BRINGMANN 1950, CASSEL u. HUTCHINSON 1954) und eine Quellsbstanz (DRAWERT 1949) werden im Zentroplasma nachgewiesen. Hinsichtlich Form und Größe und auch hinsichtlich der genaueren chemischen Zusammensetzung der für den Bereich des Zentroplasmas beschriebenen Strukturen bestehen jedoch recht unterschiedliche Aussagen. Diese lassen sich nach den vergleichenden Untersuchungen v. ZASTROWS einmal auf die verschiedene systematische Zugehörigkeit der einzelnen Objekte, zum anderen auf die beim Altern verschiedentlich zu beobachtende Vacuolenbildung oder Zerteilung der Zentralsubstanz in zahlreiche Granula zurückführen. Häufig sind diese Differenzen aber auch durch unterschiedliche Fixierungs- (siehe auch v. ZASTROW) und Färbemethoden bedingt. Hinzu kommt, daß die angewandten Färbungen

¹ Siehe die im Kapitel Zentroplasma gegebene Definition.

² DNS.

³ RNS.

vielfach unspezifisch sind bzw. ihre Spezifität nach den heute vorliegenden Untersuchungen in Frage gestellt werden muß (siehe unten).

In der vorliegenden Untersuchung wird daher das durch die Lebendbeobachtung im Phasenkontrastmikroskop gewonnene Bild vom Aufbau der Zelle den Ergebnissen färberischer und cytochemischer Nachweise und elektronenmikroskopischer Beobachtung (Ultradünnschnitte) gegenübergestellt, um so einen Beitrag zur Klärung der Natur des Zentroplasmas geben zu können. Im Vordergrund steht dabei die Frage, ob die bei verschiedenen Autoren (unter anderem BRINGMANN 1950; v. ZASTROW 1953; CASSEL u. HUTCHINSON 1954) abgebildete und mit basischen Farben darstellbare Zentralsubstanz ein einheitlicher Körper ist oder sich in morphologisch und chemisch differenzierbare Bestandteile aufteilen läßt.

Neben den im Zentroplasma gelegenen Strukturen sollen auch die im Chromatoplasma enthaltenen Granula untersucht werden. Besonders schien uns der Nachweis von Redoxfermenten von Interesse. Diese sind nach den vorliegenden Untersuchungen an tierischen und pflanzlichen Objekten an celluläre Strukturen (Mitochondrien, Mikrosomen) gebunden. Bisher wurden sie bei Blaualgen nicht beschrieben.

Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurde als Untersuchungsobjekt *Phormidium uncinatum* Gom. verwandt. Die Algen wurden auf Glasfilterplatten in mineralischer Nährlösung kultiviert (DREWS 1955a).

Als Fixierungsmittel dienten: 96%iger Äthylalkohol; gepufferte, 1%ige OsO_4 -Lösung (siehe NIKLOWITZ u. DREWS, 1. Mitt.) oder Formol (neutral)-aqua dest. 1:10 unter Zusatz von 1% CaCl_2 .

Folgende Farbstoffe bzw. Farblösungen fanden Verwendung: Acridinorange (Bayer) in gepufferter, wäßriger Lösung 1:10000; GIEMSA (Grübler, Lpz.), Stammlösung 1:50 verdünnt mit Veronal-Acetatpuffer (0,0014 mol) pH 6,8; Pararosanilin, acridinfrei, „stand“ (Bayer) zur FEULGEN-Reaktion, Ansatz nach STEFFEN; Gallocyanin (Hollborn) für die Gallocyaninchromalaunfärbung (EINARSON 1951); Thionin (Bayer) nach MAYER (ROMEIS, § 1752); Methylgrün (Merck)¹, 0,5% ig in 0,1 n Acetatpuffer, pH 4,1; Pyronin (Grübler), 0,5% ige wäßrige Lösung; Methylenblau (Bayer), Trypaflavin (Bayer) zum Phosphatnachweis nach WINDISCH u. Mitarb. (1954); Toluidinblau (Grübler) nach LINDEGREN (1950) oder 0,5% ig wäßrig; Azur I (Merck), 0,25% ige, wäßrige Lösung; Sudanschwarz B, gesättigte Lösung in Diacetin².

Für die Verdauungsversuche dienten folgende Fermente: Pepsin DAB 6 (Pepton-Atarost-Werke, Rostock), 0,05—0,1% ig in n/100 HCl; Papain (Rostock), 0,05% ig in Kaliumbiphtalat- bzw. Acetatpuffer pH 5,0 + 0,002 mol Cystein (Merck); Trypsin puriss. (Rostock); Ribonuclease (kristall., salz- und proteasefrei, Light & Co., England, bzw. ein im Institut hergest. Präparat³; Desoxyribonuclease, krist., Inst. präp.). Trypsin, RN-ase u. DN-ase wurden in Acetat-Veronal-Puffer gelöst.

¹ Zur Entfernung des Methylviolettets etwa 8 mal mit Chloroform ausgeschüttelt.

² Für die Unterstützung bei den technischen Arbeiten danken wir Frl. GIEBLER.

³ Für die Herstellung und freundliche Überlassung des Präparates danken wir Herrn Dr. VENNERT.

Als Redoxfarbstoffe dienen 5,5', 3,3'-Tetraphenyl-2,2'-Di-p-stilbenditetrazoliumchlorid¹ (in der Arbeit als Stilben-TC bezeichnet), für Vergleichsuntersuchungen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC-Merck) und Janusgrün B. TTC und Stilben-Tc wurden in 0,05—0,1%iger Konzentration in gepufferter Nährlösung angesetzt (DREWS 1955b). Während der Reaktion standen die Gläschen mit der Farblösung im Dunkeln. Die mikroskopische Beobachtung des Reduktionsverlaufes wurde zunächst nur bei Rotlicht durchgeführt, um eine Umwandlung des Farbstoffs im blauen Licht zu verhindern. Vergleichsuntersuchungen ließen jedoch keinen störenden Einfluß auf die Reaktion mit Stilben-TC erkennen. — Für die Nadi-Reaktion verwendeten wir α -Naphthol (Schering, Adlershof) und Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid (Merck). Beim Ansetzen der Lösungen richteten wir uns im wesentlichen nach den Angaben von PERNER (1952). Nach unseren Erfahrungen wird aber die Reaktion nicht beeinträchtigt, wenn man das Naphthol in einer geringen Menge Äthanol löst und dann mit aqua dest. auffüllt. — Zur Bewegungshemmung dienten in einigen Fällen schwache Dosen von 2,4-Dinitrophenol oder H₂O₂.

Die Einbettung der Objekte und die Herstellung von Schnitten für die elektronen-mikroskopische Beobachtung sind in der 1. Mitt. ausführlich beschrieben. Auf diese Darstellung wird verwiesen.

Ergebnisse

Zentroplasma

Lebendbeobachtung

Die lebende Zelle von *Phormidium uncinatum* zeigt bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop einen hellen, zentral gelegenen Bezirk von unregelmäßiger Gestalt und Größe (Abb. 1). Zumeist besteht dieser

aus einem System von lacunenartigen Verästelungen, die von der Zellmitte aus bis in die Peripherie ausstrahlen (Abb. 2). Die einzelnen Lacunen sind oft nur 0,5—1,0 μ breit. Häufig beobachtet man auch

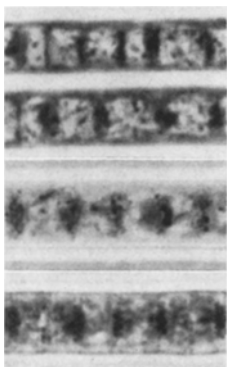


Abb. 1. *Phormidium uncinatum*. Lebend, Phasenkontrastaufnahme. Normale Einstellung des Tubus. Verschiedene Formen des Zentroplasmas. Lumipan, Obj.: H1PH 90, Ok.: Proj. 6,3, nachvergr. auf 1300:1

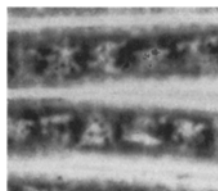


Abb. 2. *Phormidium uncinatum*. Lebend, Phasenkontrastaufnahme. Hohe Einstellung des Tubus. 1300:1

einen relativ großen Zentralbezirk, der nur wenig verzweigt ist. Diese hier beschriebenen, nicht scharf gegen das periphere Plasma abgegrenzten „Hellzonen“ entsprechen hinsichtlich ihrer Lage dem in der Literatur als

¹ Für die Herstellung und freundliche Überlassung des Präparates danken wir Herrn Dipl. chem. HERB.

Zentroplasma, Zentralkörper oder Zentralsubstanz bezeichneten Bezirk (DRAWERT 1949, CASSEL u. HUTCHINSON 1954). Wenn im folgenden der Ausdruck Zentroplasma für diesen zentralen Bezirk gebraucht wird, so soll er in dem aufgezeigten Sinn verstanden werden, nämlich rein deskriptiv als topographische Bezeichnung für die zentralen, nicht scharf gegen die peripheren Teile der Zelle abgegrenzten Bezirke, ohne damit zunächst etwas über Aufbau und Funktion aussagen zu wollen.

Im Zentroplasma liegen mehrere bis zahlreiche Granula, die häufig netzartig miteinander verknüpft oder auf langen Plasmaverdichtungen angeordnet sind. Auch einzelne, relativ große und scharf gegen das Plasma abgegrenzte Granula sind im Zentroplasma anzutreffen. Die Einschlüsse lassen bei normaler mikroskopischer Beobachtung keine Bewegung erkennen. Peripher vom Zentroplasma liegt das Chromatoplasma.

CASSEL u. HUTCHINSON (1954) bringen in ihrer Arbeit Phasenkontrast-aufnahmen von *Microcoleus*. Diese Abbildungen zeigen ebenfalls ein hell erscheinendes Zentroplasma, das granuläre Einschlüsse enthält.

Färbungen und cytochemische Nachweise

Der im Phasenkontrast hell erscheinende Bezirk der lebenden *Phormidium*-Zelle (Zentroplasma) läßt sich auch färberisch darstellen. Mit Acridinorange (1:10000) angefärbt, fluoresciert das Zentroplasma leuchtend gelb-grün. Diese kräftige Fluoreszenz konnten auch v. ZASTROW (1953) und KRIEG (1955) an Oscillatorien beobachten.

v. ZASTROW bezeichnet diesen Bezirk als Zentralsubstanz Die von ihr gegebene zeichnerische Darstellung der sich bei *Phormidium uncinatum* mit Acridinorange gelb-grün färbenden Bezirke entspricht im wesentlichen den eigenen Beobachtungen: Die feine, im Phasenkontrastmikroskop deutlich werdende Gliederung geht verloren und es erscheint ein relativ kompaktes und nur schwach verzweigtes Zentroplasma. Wahrscheinlich ist dafür die gegenseitige Überlagerung und Überstrahlung der in verschiedenen Ebenen liegenden, fluoreszierenden Bezirke verantwortlich zu machen. Die Fluoreszenz des Zentroplasmas konnte vom schwach Sauren bis ins stark Alkalische (p_H 10,0) hinein beobachtet werden.

Das Chromatoplasma fluorescierte schwach bis deutlich rot. Diese Erscheinung ist zum großen Teil durch die Eigenfluoreszenz des Chromatoplasmas bedingt.

Eine Abgrenzung von Chromato- und Zentroplasma, wie sie durch die Behandlung mit Acridinorange zu erhalten war, wird auch nach Färbung mit GIEMSA (Alkoholfixierung) deutlich. Die gesamte Zelle färbt sich violett an, das Zentroplasma jedoch kräftiger, das Chromatoplasma hingegen nur schwach. Ähnliche Ergebnisse erhält man mit Thionin und Azur I. Eine schärfere Abgrenzung des Zentroplasmas ist durch Tanninsäuredifferenzierung nach GIEMSA-Färbung zu erhalten (CASSEL u. HUTCHINSON 1954). Die auf diese Weise durchgeführten Färbungen entsprechen den bei CASSEL u. Mitarb. veröffentlichten Abbildungen von

Phormidium. Die Zelle von *Phormidium uncinatum* läßt also einen zentralen, im Phasenkontrast hell erscheinenden und mit basischen Farbstoffen darstellbaren Bezirk (Zentroplasma) erkennen.

Nach diesen orientierenden Versuchen und den Erfahrungen der Literatur durfte erwartet werden, daß im Zentroplasma Nucleinsäuren enthalten sind. Um diese getrennt nachzuweisen, wurde zunächst mit Methylgrün und Pyronin gefärbt, da diese Farbstoffe von BRINGMANN (1950), HERBST (1953) und v. ZASTROW (1953) zum Nachweis der DNS und der RNS bei verschiedenen fädigen Cyanophyceen verwandt wurden.

Nach POLLISTER u. LEUCHTENBERGER (1949), KURNICK (1950) und KURNICK u. MIRSKY (1950) ist Methylgrün bei p_H 4,1 spezifisch für DNS, Pyronin spezifisch für RNS (BRACHET 1940). Bei Anwendung von Methylgrün erhielten wir jedoch eine Grünfärbung des gesamten Plasmas. Eine Änderung des Fixierungsmittels (OsO_4 , Äthanol, Champy, Regaud), eine Vorbehandlung mit Lanthannitrat und eine Verlängerung der Färbezeit (bis 72 Std bei 4° C) führten zu keinem anderen Ergebnis. Eine anfänglich zu beobachtende Blaugrünfärbung einzelner Granula (siehe auch BRINGMANN 1950) ließ sich auf Reste von Methylviolett zurückführen, die beim Ausschütteln des Methylgrüns zurückgeblieben waren. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von ALFERT (1952) und SANDRITTER u. DIEFENBACH (siehe SANDRITTER 1955), nach denen Methylgrün nicht mehr als allein spezifisch für DNS angesehen werden kann. Denn es darf wohl mit Sicherheit angenommen werden, daß die DNS nicht diffus im ganzen Plasma verteilt anzutreffen ist (DRAWERT 1949, v. ZASTROW 1955), zumal auch Pyronin den gleichen Bezirk rot anfärbte. Nach Ribonucleaseeinwirkung ist nur das Zentroplasma noch mit Methylgrün angefärbt. Auch die Spezifität von Pyronin für RNS muß nach unseren Erfahrungen in Frage gestellt werden. Nach Alkoholfixierung und zum Teil anschließendem 2stündigem Aufenthalt in Äther-Alkohol (2:1) zur Entfernung der eventuell störenden Lipoproteide wurden die Cyanophyceen mit Trichloressigsäure (TCS, Zimmertemperatur, 42 Std) behandelt, um die RNS zu extrahieren (WINDER u. DENNENY, 1954). Doch auch nach dieser Behandlung, wie auch nach Behandlung mit Ribonuclease, war noch eine deutliche Rotfärbung zu beobachten.

Methylgrün und Pyronin eigneten sich also nicht zum getrennten Nachweis der beiden Nucleinsäuren. Günstigere Resultate konnten wir mit dem Oxazinfarbstoff Gallocyaninchromalaun¹ (EINARSON 1932, 1951; LAGERSTEDT 1948, 1949) erzielen. Dieser Farbstoff wird von beiden Nucleinsäuren quantitativ gebunden (DIEFENBACH u. SANDRITTER 1954; SANDRITTER 1954, 1955). Auch seine Spezifität ist nur relativ. So färbt er z. B. Metaphosphate (STICH 1953). Doch lassen sich diese Nebeneffekte durch entsprechende Vorbehandlung einschränken.

Wird *Phormidium* nach Alkoholfixierung in GCA gegeben, so färbt sich das gesamte Zentroplasma deutlich blau-violett an. Innerhalb des diffus tingierten Bereichs erscheinen zahlreiche kleine und mehrere große Granula kräftig bläulich oder mehr rötlich-violett angefärbt. Nach Fixierung mit OsO_4 oder Formol-Ca

¹ Im folgenden als GCA bezeichnet.

erhielten wir ähnliche Bilder; nur waren an der Peripherie des Zentroplasmas noch kleine, ebenfalls gefärbte Granula zu beobachten. Die Ergebnisse der Färbung mit GCA sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Wie noch näher auszuführen sein wird, lassen sich mit Galloxyaninchromalaun 3 Arten von Granula im diffus angefärbten Zentroplasma darstellen:

1. Kleine, wahrscheinlich aggregierte, meist zentral gelegene Granula (z. Gr.), 2. Granula, die auch ohne weitere Vorbehandlung nach der Färbung vergrößert erscheinen und sich kräftig rot-violett anfärben (gr. Gr.), 3. kleine, peripher gelegene Granula, die nach Alkoholfixierung nicht deutlich nachzuweisen sind (p. Gr.).

Nach Ribonucleasebehandlung (pH 6,4; 45° C; 30 min) und anschließendem Aufenthalt in GCA ist die diffuse Anfärbung auf einen zentralen Bezirk im Zentroplasma beschränkt oder fehlt ganz (Abb. 3). Die Granula sind ebenfalls angefärbt. Ihre Zahl scheint jedoch häufig verringert zu sein. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Trichloressigsäure¹-Extraktion (20° C, 24 Std). Die RNS ist also sowohl diffus im Zentroplasma verteilt, wie auch möglicherweise an einzelne Granula gebunden.

Die zentral gelegenen, auch nach Ribonucleasebehandlung tingierbaren Strukturen enthalten DNS und eventuell noch andere, sich mit GCA färbende Substanzen.

Nach Desoxyribonuclease-Einwirkung (0,05% ig, 37° C, pH 7,4) und Färbung ist die zentrale, feine Körnelung (z. Gr., siehe oben) nicht mehr zu beobachten, die diffuse Färbung und die Tingierbarkeit der übrigen Granula bleibt bestehen. Werden die Algen 7 min mit TCS bei 100° C behandelt, so färbt sich in der Zelle nichts mehr an. Bei dieser Temperatur werden mit Trichloressigsäure, RNS, DNS und kond. Phosphate extrahiert (EBEL 1952; WINDER u. DENNENY 1954). Aus dem Farbbild nach Behandlung mit Fermenten bzw. TCS ergibt sich, daß die kleinen, zumeist miteinander aggregierten Granula (z.Gr.) DNS enthalten.

Zur Sicherung dieses Ergebnisses wurde die FEULGEN-Reaktion durchgeführt.

Fix.: Äthanol oder gepufferte OsO_4 -Lösung, Hydrolyse 15 min bei 50° C oder 12 Std bei Zimmertemperatur; Färb. 4 Std, spülen 3mal 10 min in SO_2 -haltigem Wasser.

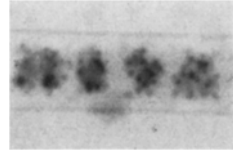


Abb. 3. *Phormidium uncinatum*.
Fix.: Äthanol, 95% ig.
Galloxyaninchromalaunfärbung
nach Ribonucleasebehandlung.
1650:1

¹ TCS.

In Übereinstimmung mit POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKI (1929) und DRAWERT (1949) erhielten wir nach beiden Fixierungen im Zentroplasma eine Ansammlung zarter, granulärer Elemente, die häufig netzartig verbunden sind; aber auch einzelne größere Granula, die miteinander in Verbindung stehen, färbten sich rot an. Die von PETTER (1933) bei einer *Phormidium*-Art erhaltene positive Reaktion in Gestalt paralleler, anastomosierender Fäden konnte niemals beobachtet werden. Gelegentlich zeigten die Trichome eine schwache, diffuse Rotfärbung im gesamten Plasma, die auch nach Alkoholextraktion auftrat (siehe auch DRAWERT 1949). Die bei der FEULGEN-Reaktion sich anfärbende Substanz entspricht hinsichtlich Größe und Lage dem Bereich, der sich nach TCS-Extraktion mit GCA tingiert. Damit ist das Ergebnis der GCA-Färbung bestätigt.

Sowohl nach Ribo- bzw. Desoxyribonucleasebehandlung, wie auch nach Einwirkung beider Fermente (nacheinander) bleiben im Zentroplasma gelegene Granula (gr. Gr. u. p. Gr.) mit GCA färbbar. Auch Pepsin, Trypsin und Papain haben auf die Anfärbbarkeit dieser Granula keinen Einfluß.

Die nach GCA-Einwirkung sich vergrößernden Granula (gr. Gr.) färben sich mit Methylenblau und Toluidinblau (WIAME 1947; LINDEGREN 1950) metachromatisch. Es ist daher zu vermuten, daß an ihrem Aufbau kondensierte Phosphate (Meta- oder Polyphosphate?) beteiligt sind. Nach den Methoden von WACHSTEIN u. PISANO (1950) und WINDISCH u. Mitarb. (1954) ließen sich in den Granula Phosphationen nachweisen. Bei unfixiertem, sowie mit Alkohol oder Aceton fixiertem Material wird der Phosphatnachweis nach WINDISCH negativ, wenn vorher mit TCS (4 Std, 20° C) extrahiert wird. Es handelt sich also um eine säurelösliche Phosphorverbindung. Nach dem negativen Ausfall des Phospholipoidnachweises nach BAKER (siehe GOMORI 1953), der Sudan-schwarz B-Färbung und der PAS-Reaktion zum Nachweis von Kohlenhydraten (HOTCHKISS 1948; McMANUS 1948) läßt sich ausschließen, daß der Phosphor in diesen Granula an Lipide als Phosphatid oder an Kohlenhydrate gebunden auftritt. Es können jedoch in den meisten Granula (gr. Gr.) Proteine nachgewiesen werden (Proteinnachweis nach MAZIA u. Mitarb. 1953). Es ist nach den vorliegenden Ergebnissen anzunehmen, daß der Phosphor in diesen Granula (gr. Gr.) als säurelösliches Phosphat — wahrscheinlich Polyphosphat (EBEL 1952) — auftritt.

Die dritte Gruppe der im Zentroplasma anzutreffenden und sich mit GCA färbenden Granula (p. Gr.) enthält Phosphatide (Nachweis nach BAKER). Sie sind deutlich nur nach Formol-Ca-Fixierung nachzuweisen und liegen, wie oben schon näher beschrieben, peripher im Zentroplasma.

Tabelle zu den Färbungen

	Zentroplasma			Chromatoplasma
	z. Gr.	gr. Gr.	p. Gr.	Qu. Gr.
FEULGEN.	+	—	—	—
Gallocyaninchromalaun	+	+	+	(+)
			n. Formol-Ca	
GCA n. TCS (100° C) .	—	—	—	—
GCA n. TCS (20° C; 48 Std)	+	—	—	—
GCA n. RN-ase	+	+	+	—
			n. Formol-Ca	
GCA n. DN-ase	—	+	+	—
GCA n. Papain	—	+	—	—
Phosphatidnachweis . .	—	—	+	±
PAS-Reaktion	—	—	—	—
P.-Nachweis (WINDISCH)	±	+	+	—
M. B.	+	metachrom.+	+	—
GIEMSA	+	+	+	—
			n. Formol-Ca	
Thionin	blau	rötlich	—	—
	+	+	—	—
Stilben-TC	—	—	—	+
Nadi-Reaktion	—	—	—	+
Janusgrün B	+	diffus blaugrün	—	+
				rot

M. B. Methylenblaufärbung, PAS Perjodsäure-Schiff-Reaktion, GCA Gallocyaninchromalaunfärbung, TCS Trichloressigsäure, 5% ig, Abkürzung für Zentroplasma Granula siehe Text S. 152.

Zusammenfassend zeigt sich also nach den vorliegenden Ergebnissen für den Aufbau des Zentroplasmas bei *Phormidium uncinatum* folgendes Bild: Im gesamten Bereich des sich phasenoptisch hell darstellenden Zentroplasmas liegt die RNS diffus verteilt. Die DNS ist an relativ kleine, meist netzartig verknüpfte Granula (z. Gr.) gebunden, die als „Chromidialapparat“ im Zentroplasma angeordnet sind. Weiterhin sind im Zentroplasma phosphatidhaltige, peripher gelegene Granula (p. Gr.) und Granula, an die eine säurelösliche Phosphorverbindung (kondensierte Phosphate — THILO 1950, 1952) geknüpft ist (gr. Gr.), anzutreffen. Wie weit auch die RNS am Aufbau einzelner Granula beteiligt ist, läßt sich noch nicht eindeutig entscheiden, da bei einer Ex-

traktion der die RNS eventuell maskierenden kondensierten Phosphate mittels TCS auch die RNS mit entfernt wird. Nach Behandlung mit der zur Verfügung stehenden Phosphatase ließ sich keine Veränderung der Granula beobachten.



Abb. 4. *Phormidium uncinatum*. Längsschnitt. Elektronenmikroskopische Aufnahme. Originalaufnahme 13 000:1, nachvergrößert

Elektronenmikroskopische Beobachtungen

In median geführten Schnitten beobachtet man hellere Bezirke, die von undeutlich begrenzten, kontrastreichen Strukturen durchsetzt sind (Abb. 4). Diese helleren Bezirke lassen sich nicht scharf gegen das Chromatoplasma abgrenzen. Lamellen werden in ihrem Bereich nicht gefunden. Die kontrastreichen Strukturen bestehen aus faden- bis strangförmigen Gebilden, die von granulären Elementen durchsetzt sind. Eine

charakteristische Feinstruktur dieser Gebilde konnte nicht festgestellt werden. Die Lage und Anordnung der stark elektronenstreuenden Substanz läßt nach Rekonstruktion der Ultradünnschnitte und nach Vergleich mit den lichtmikroskopischen Ergebnissen die Vermutung zu, daß es sich hier um die netzartig verknüpften, DNS-haltigen Strukturen handelt. Verschiedentlich konnte eine Anhäufung von kontrastreichen runden oder weniger kontrastreich und unregelmäßig geformten Granula im Zentroplasma beobachtet werden. Die kontrastreichen Granula (gr. Gr.) zeigen nach starkem Elektronenbeschuß Sublimationserscheinungen, wie sie wiederholt beschrieben wurden (KÖNIG u. WINKLER 1948; BRINGMANN 1950; NIKLOWITZ u. DREWS 1955). Es liegt die Vermutung nahe, daß an ihrem Aufbau — wie auch die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergeben haben — kondensierte Phosphate beteiligt sind. Eine genauere Analyse der im Zentroplasma gelegenen Strukturen muß einer späteren Untersuchung vorbehalten bleiben.

Granuläre Einschlüsse des Chromatoplasmas

Im phasenkontrastmikroskopischen Bild der lebenden Zelle erscheinen im Bereich der Querwand Granula, die sich von dem sie umgebenden Plasma deutlich abheben. Besser lassen sie sich darstellen, wenn man die Zelle mit Formol-Ca fixiert und dann im Hellfeld betrachtet. Man erkennt dann auf beiden Seiten der Querwand eine Reihe von Granula, die sich oft genau gegenüber liegen. Außer diesen „Querwandgranula“ liegen im Chromatoplasma verstreut einzelne Granula, die keine bestimmte Anordnung erkennen lassen.

Nachweis von Redoxfermenten. BIELIG, KAUSCHE und HAARDICK (1949) wandten die auf KUHN u. JERCHEL (1941) zurückgehende Methode der Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-Reduktion durch lebende Zellen als cytochemischen Test bei Bakterien an. Seither konnte in zahlreichen Untersuchungen (MATTSON 1947; KUN 1951; BRODIE u. GOTS 1952; HAHN 1952; PREUNER u. Mitarb. 1952; BURNS 1953; KELLENBERGER u. HUBER 1953; PARKER 1953; SATO 1953; SOMERSON 1953; ZIEGLER 1953; DAVIS u. Mitarb. 1954; HARTMANN u. LIU 1954; HUGO 1954; KUHN u. LINKE 1954; NEUMANN u. KOCH 1954) in vivo und in vitro nachgewiesen werden, daß verschiedene Dehydrogenasen Tetrazoliumsalz zu reduzieren vermögen, dieses sich also zum Nachweis der genannten Fermente eignet. Nicht unwidersprochen blieb dagegen die von BIELIG u. Mitarb. (1949, 1952) vertretene Ansicht, daß das Formazan am Orte seiner Bildung abgelagert wird und eine genaue Lokalisierung der Fermente ermöglicht (WEIBULL 1953; ZIEGLER 1953 u. a.). Als Hauptargument wird angeführt, daß das Formazan im Plasma Kristalle bildet, die Strukturen vortäuschen können, bzw. das Formazan des normalen TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid), welches gut fettlöslich ist, sich sekundär in der lipoiden Phase der Zelle anreichert.

Trotzdem erscheint es uns möglich, wie noch näher auszuführen sein wird, auf Grund der Ablagerung von Stilben-TC cytologische Aussagen zu treffen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde fast ausschließlich das Stilben-TC verwendet, dessen blaues Formazan sich kaum in den üblichen Fettlösungsmitteln löst.

Etwa 30 min nach Einbringen der Algen in die Stilben-TC-Lösung (Nährlösung + 0,05% Stilben-TC, p_H 7,4; siehe DREWS 1955b) lassen sich die ersten Anzeichen einer deutlichen Reaktion beobachten: Granula, die an den Querwänden und den Stellen der Längswände liegen, von denen aus die Querwandbildung einsetzt (Qu. Gr.), färben sich dunkelblau an (Abb. 5). Es läßt sich wegen der Kleinheit der Granula nicht entscheiden, ob es sich um eine Ein- oder Anlagerung des Formazans handelt. Später tritt der Farbstoff auch noch in Form länglicher, nadel-förmiger Gebilde in Erscheinung. Läßt man die Blaualgen 12 oder mehr Stunden in der Stilben-TC-Lösung, so kann in einzelnen Fällen das gesamte Plasma blau gefärbt sein und an den Querwänden und zentral gelegenen Granula die Ablagerung von Formazan einsetzen. Zumeist bleibt aber die Formazanablagerung auf die oben- genannten Querwandgranula und die länglichen Gebilde beschränkt.

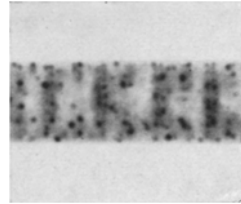


Abb. 5. *Phormidium uncinatum*. Lebend, Stilben-TC-Reduktion. Ablagerung des Formazan in den Querwandgranula. 1650:1

Aus den hier geschilderten Beobachtungen darf wohl geschlossen werden, daß die primär in den beschriebenen Granula beginnende Stilben-TC-Reduktion auf die Tätigkeit von reduzierenden Fermenten (Dehydrogenasen) zurückgeführt werden kann.

Die gleichen Strukturen, an denen Stilben-TC reduziert wird, färben sich mit Janusgrün B (0,02%, in Acetat-Veronal-Puffer 0,0014 M, 35 min) kräftig blaugrün an. Bei bestimmten p_H -Werten (z. B. p_H 5,0) sind im schwach diffus blaugrüngefärbtem Plasma an der Querwand nach etwa 35 min deutlich rotgefärbte Granula zu beobachten. Janusgrün B ist also ausschließlich im Bereich der Querwandgranula zum roten Diäthylsafranin reduziert worden (LAZAROW u. COOPERSTEIN 1953). Auch aus dieser Beobachtung kann auf eine Beteiligung reduzierender Fermente am Aufbau der Querwandgranula geschlossen werden.

Die Nadi-Reaktion dient dem Nachweis der Cytochromoxydase (SCHÜMMELFEDER 1949; PERNER 1952; BAUTZ 1954). Beim Einbringen der Blaualgen in das Reaktionsgemisch kann unter Umständen schon nach 5 min eine deutlich positive Reaktion beobachtet werden.

Die Zeit, die vom Einbringen der Blaualgen in die Versuchslösung bis zum Sichtbarwerden der Reaktion vergeht, läßt eine Abhängigkeit von der Konzentration des Puffers erkennen. Bei Verwendung von 0,15 mol Phosphat-Puffer wird die Reaktion rasch (5—10 min) in 0,015 mol nach 20 min und in 0,0075 mol nach etwa 60 min deutlich.

Die Reaktion wird durch KCN ($1 \cdot 10^{-3}$ mol) und H_2S vollständig gehemmt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit PERNER und läßt auf ein schwermetallhaltiges Ferment schließen.

Verfolgt man den Ablauf der Nadi-Reaktion mikroskopisch, so sieht man, daß das Indophenolblau zuerst im Bereich der Quer- und Längswände in außerordentlich kleinen Granula gespeichert wird. Später ist der Farbstoff auch an anderen Stellen im Chromatoplasma anzutreffen. Die Bildung beginnt also in den gleichen Bezirken der Zelle, in denen primär Formazan entsteht. Es besteht demnach die Möglichkeit, daß beide Reaktionen an die gleichen Strukturen geknüpft sind. Da das bei der Nadi-Reaktion entstehende Indophenolblau jedoch lipoidlöslich ist, muß man damit rechnen, daß der Farbstoff sekundär in der lipoiden Phase der Zelle angereichert wird. Dafür spricht auch, daß zumindest

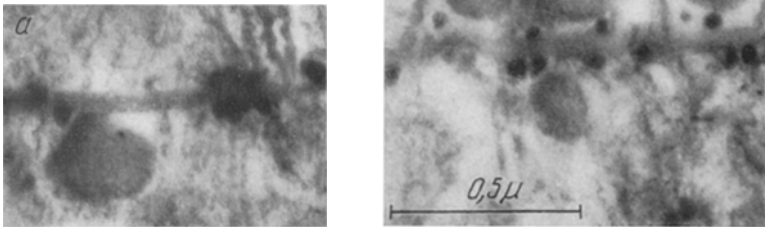


Abb. 6. *Phormidium uncinatum*. Strukturierte Granula im Bereich der Querwand. Originalaufnahme 13000:1, nachvergrößert. Elektronenmikroskopische Aufnahme

ein Teil der Querwandgranula Phospholipoide enthält (Nachweis nach BAKER, siehe GOMORI 1953, Sudanschwarz B-Färbung schwach positiv). Dagegen läßt sich geltend machen, daß das Indophenolblau sehr rasch in den Querwandgranula und erst später auch in anderen Granula erscheint. Es darf also wohl mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß in der Nähe der Querwände in granulären Strukturen sowohl reduzierende wie auch oxydierende Fermentsysteme lokalisiert sind. Es läßt sich aber lichtmikroskopisch nicht ausschließen, daß im Bereich der Querwände mehrere Arten von Granula vorhanden sind.

Im Chromatoplasma liegen dort, wo eine junge Querwand angelegt wird, oder sich junge Wände bilden, ebenfalls „Querwandgranula“. Vereinzelt trifft man im Chromatoplasma auch Granula, die aller Wahrscheinlichkeit nach kondensierte Phosphate enthalten. Sie verhielten sich färberisch und nach TCS-Extraktion wie die entsprechenden Gebilde im Zentroplasma (gr. Gr.).

Glykogen konnte niemals in Form von Granula beobachtet werden (Perjodsäure-Schiff-Reaktion, Jod-Jodkali). Wir beobachteten immer eine diffuse Anfärbung des gesamten Plasmas, wie sie auch DRAWERT (1949) beschreibt.

Im Elektronenmikroskop lassen sich an Hand von Schnitten durch *Phormidium uncinatum* 2 Arten von Granula nachweisen (Abb. 4), einmal kleine, stark osmiophile, die meist unmittelbar der Wand anliegen (Abb. 6), zum anderen größere, strukturierte Granula (Abb. 6a). Die großen Granula messen bis 300 $m\mu$ Dicke, die kleinen (Abb. 6b) haben einen Durchmesser von etwa 40 $m\mu$ und liegen damit unter der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes. Da aber im Lichtmikroskop deutlich die Anlagerung von Formazan an Querwandgranula beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, daß zumindest die Dehydrasen an die großen Granula gebunden sind. Dafür spricht auch, daß die großen Granula strukturiert sind und somit in Aufbau und Funktion an pflanzliche und tierische Mitochondrien erinnern (PALADE 1953). Nach dem lichtmikroskopischen Bild zu urteilen, ist die Nadi-Reaktion wahrscheinlich an die gleichen Strukturen wie die TC-Reduktion gebunden. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß auch die kleinen Granula Träger von Fermenten sind. In der Größenordnung entsprechen sie den Mikrosomen.

Diskussion

Nach den vorliegenden Untersuchungen läßt sich die Zelle von *Phormidium uncinatum* in ein phasenkontrastmikroskopisch hell erscheinendes Zentroplasma und in ein die übrige Zelle ausfüllendes Chromatoplasma, an das die Assimilationspigmente gebunden sind, einteilen. Eine distinkte Grenze, etwa in Form einer Membran, besteht nicht. Nach dem elektronenmikroskopischen Bild kann man das Zentroplasma auch als den zentralen Raum bezeichnen, der nicht von den Lamellenpaketen des Chromatoplasmas, die die gesamte übrige Zelle durchziehen, durchsetzt ist. Mit der FEULGEN-Reaktion konnten im Bereich des Zentroplasmas DNS-haltige Strukturen nachgewiesen werden, die eine recht mannigfaltige Anordnung zeigten (nach Fixierung mit gepufferter OsO_4 -Lösung). So waren ein Netzwerk mit granulaartigen Verdickungen, vielfach gekrümmte Stränge oder wenige (meist 2) miteinander verknüpfte, größere Granula zu beobachten. Nach Alkoholfixierung waren die Strukturen etwas gröber. Niemals traten jedoch bei der FEULGEN-Reaktion so kompakte Gebilde auf, wie sie BRINGMANN (1950, 1952) an *Lyngbia aerogineo-coerulea* und v. ZASTROW (1953) an *Oscillatoria limosa* als Karyoid bzw. Zentralsubstanz beschrieben haben. Die Auffassung BRINGMANNS, daß DNS, RNS und Metaphosphate in einem runden, granulaartigen Komplex (Karyoid) vereint sind, der in Ein- oder Mehrzahl in der Zelle auftritt, ließ sich für unser Objekt nicht bestätigen, auch wenn man die Möglichkeit einer granulären Zerteilung des Zentroplasmas im Alter, wie sie von v. ZASTROW für verschiedene Arten nachgewiesen wurde, mit berücksichtigt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ließen sich zwar auch (wie von BRINGMANN 1950; BISWAS

1953; v. ZASTROW 1953 und HERBST 1954) DNS, RNS und Phosphatverbindungen im Zentroplasma nachweisen; sie waren aber auf verschiedenen Strukturen angeordnet:

Im Bereich der diffus verteilten RNS lagen die nucleal-positiven Strukturen und davon unabhängig die verschiedenen Phosphatgranula.

Es wäre denkbar, die unterschiedliche Anordnung der DNS-haltigen Substanz auf verschiedene Teilungsstadien zurückzuführen. So lange aber der Mechanismus dieser „Kern“-Teilung noch völlig im Dunklen liegt, muß diese Frage unbeantwortet bleiben.

Wie oben dargestellt, liegen im Bereich der Querwände Granula, die reich an reduzierenden und oxydierenden Fermenten sind. Sie lassen sich schon in frühen Stadien der Querwandbildung nachweisen und dürften eine Bedeutung für die stoffwechselphysiologischen Vorgänge bei der Bildung der Querwand besitzen.

Zusammenfassung

1. Das Zentroplasma von *Phormidium uncinatum* ist ein phasenoptisch hell erscheinender, lacunenartig verzweigter Bezirk, der ohne scharfe Abgrenzung in das Chromatoplasma übergeht.

2. In dieses Zentroplasma, das in diffuser Verteilung Ribonucleinsäure enthält, sind drei verschiedene, granulaartige Elemente eingelagert:

- a) kleine, meist netzartig verbundene, FEULGEN-positive Granula,
- b) größere, verstreut liegende Granula, die Phosphate, wahrscheinlich kondensierte Phosphate (THILO 1951, 1952) und eventuell auch RNS enthalten und
- c) kleine, peripher gelegene Granula, die Phospholipoide enthalten.

3. Elektronenoptisch erscheint das Zentroplasma als ein System schmaler, unscharf gegen das lamelläre Chromatoplasma abgegrenzter Bezirke. In diesem hell erscheinenden Zentroplasma liegen unregelmäßig gestaltete, dunkel erscheinende Plasmapartien, in die zum Teil Granula eingelagert sind.

4. Im Bereich der Querwand konnten Granula mit Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden. Sie reduzieren Stilben-TC und Janusgrün. Im Ultradünnschnitt erweisen sie sich als strukturiert und besitzen einen Durchmesser von etwa 300 m μ .

Außer diesen großen Granula lagen im Bereich der Querwand kleine (Durchmesser 40 m μ), stark osmiophile Granula. Über die Funktion dieser Granula läßt sich zur Zeit noch nichts aussagen.

Literatur

ALFERT, M.: Biol. Bull. **103**, 145 (1952).

BIELIG, H.-J., G. A. KAUSCHE u. H. HAARDICK: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakterien. Z. Naturforsch. 4b, 80 (1949). — BISWAS, B. B.: Investigation of ribo- and desribonucleic acid in Cyanophyceae. Current Sci. **22**, 346 (1953). — BRACHET, J.: The use of basic dyes and Ribonuclease for the cytochem. detection of RNA. Quart. J. Microsc. Sci. **94**, 1 (1953). — BRINGMANN, G.: Die Organisation der Kernäquivalente der Spaltpflanzen. Zbl. Bakter. II, **107**, 40 (1952). — Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oszillatorien. Planta (Berl.) **38**, 541 (1950). — BRODIE, A. F., and J. S. GOTS: The reduction of tetrazolium salts by an isolated bact. flavoprotein. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 588 (1952). — BURNS, L., and W. MILITZER: Organelle nature of a cell granula from a thermophilic bact. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 411 (1953).

CASSEL, W. A., and W. G. HUTCHINSON: Nuclear studies on the smaller Mxyo-phyceae. Exper. Cell. Res. **6**, 134 (1954).

DAVIS, J. C., L. C. WINTERSCHIED, P. E. HARTMANN and S. MUDD: A cytolog. investigation of mitochondria of 3 strains of *S. typhosa*. J. Histochem. Cytochem. **1**, 123 (1953). — DIEFENBACH, H., u. W. SANDRITTER: Die quantitative Bindung von Gallocyaninchromalaun. Acta histochem. **1**, 55 (1954). — DRAWERT, H.: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. Planta (Berl.) **37**, 161 (1949). — DREWS, G.: a) Zur Kultur der Cyanophyceen. Naturwissenschaften **42**, 397 (1955); b) Zur Frage der TTC-Reduktion bei Cyanophyceen. Naturwissenschaften **42**, 646 (1955).

EBEL, J. P.: Recherches sur les polyphosphates. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 321 (1952). — EINARSON, L.: Amer. J. Pathol. **8**, 295 (1932). — EINARSON, L.: On the theory of gallocyanin-chromalaun staining. Acta path. scand. (Kobenh.) **28**, 82 (1951).

GOMORI, G.: Microscopic histochemistry. Chicago 1953.

HAHN, F. E.: Über die Kernäquivalente und Reduktionsorte in Bakt. Naturwissenschaften **39**, 527 (1952). — HARTMANN, P. E., and C. LIU: Comparative Cytology of wild type *Saccharomyces*. J. Bact. **67**, 77 (1954). — HERBST, F.: Zytologische Untersuchungen an Cyanophyceen. Ber. dtsh. bot. Ges. **66**, 283 (1953). — HERBST, Z.: Über die Kernäquivalente von *Aphanothece cald.* und *Pseudanabaena cat.* Ber. dtsh. bot. Ges. **67**, 183 (1954). — HOTCHKISS, R. D.: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures. Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948). — HUGO, W. B.: The use of 2,3,5-triphenyltetrazoliumbromid in determining the dehydrogenase activity of *Bact. coli*. J. Appl. Bact. **17**, 31 (1954).

KELLENBERGER, E., et L. HUBER: Contribution à l'étude des équivalents des mitochondries dans les bactéries. Experientia (Basel) **9**, 287 (1953). — KÖNIG, H., u. A. WINKLER: Über Einschlüsse von Bakterien und ihre Veränderungen im Elektronenmikroskop. Naturwissenschaften **35**, 136 (1948). — KRIEG, A.: Nachweis von Kernäquivalenten in Cyanophyceen. Experientia (Basel) **10**, 204 (1955). — KUHN, R., u. D. JERCHEL: Über Invertseifen VIII. Ber. dtsh. Chem. Ges. **74**, 949 (1941). — KUHN, R., u. F. LINKE: Quantitativer Vergleich der enzymatischen Hydrierung von Methyleneblau und TTC. Liebigs Ann. **578**, 155 (1952). — KUN, E.: Mechanism of enzymatic reduction of TTC. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 195 (1951). — KURNICK, N. B., and A. E. MIRSKY: Methyl green-pyronin. J. Gen. Physiol. **33**, 265 (1950). — KURNICK, N. B.: The quantitative estimation of DNA based on methyl green staining. Exper. Cell. Res. **1**, 151 (1950).

LAGERSTEDT, S.: *Acta anat.* (Basel) **5**, 217 (1948). — LAZAROW, A., and S. J. COOPERSTEIN: Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 234 (1953). — LINDEGREN, C. C.: The relation of metaphosphate formation to cell division in yeast. *Exper. Cell. Res.* **2**, 275 (1950).

MCLEAN, R. A., S. MUDD and J. C. DAVIS: The differentiation of mitochondria in strains of cocci. *J. Bacter.* **69**, 541 (1955). — McMANUS, J. F.: Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* **23**, 99 (1948). — MATTSON, A. M.: TTC as a dye for vital tissues. *Science* (Lancaster, Pa.) **106**, 294 (1947). — MAZIA, D., P. A. BREWER and M. ALFERT: The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.* **104**, 57 (1953).

NEUMANN, K.-H., u. G. KOCH: Fortschr. bei der histochemischen Lokalisation dehydrierender Enzyme. *Verh. anat. Ges. Erg. Heft zu Bd. 100 d. Anat. Anz.* **100**, 228 (1954). — NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikrobiol.* **23**, 123 (1955). — Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, **1**. *Mitt. Arch. Mikrobiol.* **24**, 134 (1955).

PALADE, G. E.: An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 188 (1953). — PARKER, J.: Some applications and limitations of tetrazoliumchloride. *Science* (Lancaster, Pa.) **118**, 77 (1953). — PERNER, E. S.: Zellphysiologische und zytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochromoxydase. *Biol. Zbl.* **71**, 43 (1952). — PETTER, H. F.: La réaction nucléaire de Feulgen chez quelques végétaux inférieurs. *C. r. Acad. Sci. (Paris)* **197**, 88 (1933). — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHEWSKY: Zur Frage der Struktur der Cyanophyceenzelle. *Arch. Protistenkde.* **67**, 11 (1929). — POLLISTER, A. W., and C. LEUCHTENBERGER: The nature of the specificity of methylgreen for chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **35**, 111 (1949). — PREUNER, R., u. J. v. PRITZWITZ u. GAFFRON: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakt. Naturwissenschaften **39**, 128 (1952).

SANDRITTER, W., H. DIEFENBACH u. F. KRANTZ: Über die quantitative Bindung von RNS mit Gallocyanin-Chromalaun. *Experientia* **X**, 210 (1954). — SANDRITTER, W.: Die Nachweismethoden der Nucleinsäuren. *Z. wiss. Mikrosk.* **62**, 283 (1955). — SATO, S.: The histochemical detection of succinic dehydrogenase with 2,3,5-TTC. *Bot. Mag. (Tokyo)* **66**, 277 (1953). — SCHÜMMELFEDER, N.: Bausteinanalyse von Geschwulstzellen. *Z. Krebsforsch.* **58**, 666 (1949). — SOMERSON, N. L., and H. E. MORTON: Reduktion von TTC-Salzen durch PPLO-Organismen. *J. Bacter.* **65**, 245 (1953). — STEFFEN, K.: pers. Mitteilung. — STICH, H.: Der Nachweis und Verhalten von Metaphosphaten. *Z. Naturforsch.* **8b**, 36 (1953).

THILO, E.: Aus der Chemie der kondensierten Phosphate. *Angew. Chemie* **63**, 508 (1951). — Die Konstitution der kond. Ph. Chem. Techn. **4**, 345 (1952).

WACHSTEIN, M., and M. PISANO: A new staining technique for polarbodies. *J. Bacter.* **66**, 357 (1950). — WEIBULL, C.: Observations on the staining of *Bac. megat.* with TTC. *J. Bacter.* **66**, 137 (1953). — WIAME, J. M.: The metachromatic reaction of metaphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 3146 (1947). — WINDER, F., and J. M. DENNENY: Metaphosphate in mycobacterial metabolism. *Nature (Lond.)* **174**, 352 (1954). — WINDISCH, F. D., STIERAUD u. H. HAEHN: Über den Nachweis der Zellphosphate. *Protoplasma (Wien)* **42**, 345 (1953).

ZASTROW, E. v.: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. *Arch. Mikrobiol.* **19**, 174 (1953). — ZIEGLER, H.: Reduction of TTC in Pfl. *Z. Naturforsch.* **8b**, 662 (1953).