

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin)

## Untersuchungen über die granulären Einschlüsse und das Reduktions-Oxydations-Vermögen der Cyanophyceen\*

IV. Mitteilung der Reihe:

Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen

Von

ILSE TISCHER

(Eingegangen am 6. April 1957)

Die Cyanophyceen sind in den letzten Jahren wieder öfters in cytologischer Hinsicht untersucht worden. Die Frage nach den Kernäquivalenten und nach der Natur der Granula ist aber noch weitgehend ungeklärt. Eine Zusammenfassung der älteren Literatur findet sich bei DRAWERT (1949).

DRAWERT (1949) bestätigte das bereits früher von verschiedener Seite festgestellte Vorhandensein einer feulgenpositiven Substanz im zentralen Bereich des Plasmas der Cyanophyceenzelle. Die Frage, ob die nach Färbung mit basischen Farbstoffen neben dieser zentralen Substanz besonders auffällig in Erscheinung tretenden sogenannten metachromatischen Körperchen oder Volutinkörnchen präformierte Gebilde der Zelle oder nur, wie CHOLNOKY (1937) annimmt, durch den Farbstoff herbeigeführte Entmischungsprodukte des Plasmas sind, läßt DRAWERT noch offen. Auf Grund elektronenmikroskopischer und cytochemischer Untersuchungen gelangt BRINGMANN (1950, 1952) zu der Auffassung, daß in der Cyanophyceenzelle nur völlig gleichartig beschaffene Granula vorkommen. Sie sollen Ribonucleinsäure, Desoxyribonucleinsäure und Phosphat besitzen. BRINGMANN bezeichnet sie als Kernäquivalente oder Karyoide. Auch HERBST (1953, 1954) betrachtet die metachromatischen Körperchen als Kernäquivalente. v. ZASTROW (1953) weist jedoch wieder das Vorhandensein feulgenpositiver Strukturen in der Zentralsubstanz nach (vgl. auch DRAWERT u. METZNER 1956). Die metachromatischen Körperchen werden von ihr als denaturierte Zentralsubstanz aufgefaßt. v. ZASTROW vermutet, daß unterschiedliche experimentelle Befunde auf die Untersuchung von Objekten verschiedenen Alters und die Verwendung ungleicher Fixierungs-

---

\* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin, 1957.

methoden zurückzuführen sind. KRIEG (1954) sowie CASSEL u. HUTCHINSON (1954) vertreten wieder die alte Auffassung, wonach die metachromatischen Körperchen nichts mit einer im zentralen Bereich des Plasmas gelegenen Substanz, welche Kernfunktion hat, gemein haben.

In Anbetracht dieser unterschiedlichen Auffassungen ergab sich die Notwendigkeit, die Einschlüsse im Plasma der Cyanophyceen erneut zu untersuchen.

Nach BRINGMANN (1952) färben sich die von ihm als Karyoide bezeichneten Gebilde mit Janusgrün. Diese Färbung gelingt nur bei Luftzutritt; es war deshalb von Interesse, auch das Verhalten der Cyanophyceen gegenüber Redox-Indicatoren zu untersuchen. Nach PRÁT (1945) treten bei Behandlung lebender Cyanophyceen mit Polyphenolen, Phenylendiamin und Aminophenol dunkle Granulationen in den Zellen auf. DREWS (1955) sowie DREWS u. NIKLOWITZ (1956) unterscheiden in den Zellen von *Phormidium uncinatum* 5 verschiedene Arten von granulären Einschlüssen. Im peripheren Bereich des Plasmas gelegene, im Elektronenmikroskop strukturiert erscheinende Granula färben sich nach ihren Angaben mit Redox-Indicatoren. Sie werden deshalb als Fermentzentren betrachtet.

### I. Versuchsmaterial und Methodik

Als Untersuchungsobjekte dienten Vertreter der Gattungen *Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Oscillatoria* und *Lyngbya*. Die Cyanophyceen wurden in Petri-Schalen auf 1%igem mit Knopscher Nährlösung oder Erddekotk bereitetem Agar (siehe GETTLER 1932) oder in Knopscher Nährlösung kultiviert. Für verschiedene Versuche wurden sie direkt ihrem natürlichen Medium aus dem Gewächshaus entnommen. Zur Fixierung dienten: absoluter und 96%iger Äthylalkohol, 1%ige OsO<sub>4</sub>-Lösung sowie Formol (1:10 mit aqua dest. verdünnt). An Farbstoffen wurden verwendet: Methylenblau (Grübler, Leipzig; Merck), Toluidinblau (Bayer), beide 1:10000 in Leitungswasser; Methylgrün (Merck)<sup>1</sup> 0,5%ig in aqua dest. oder in 0,5%iger Essigsäure; Pyronin stand. (Bayer) 0,5%ig in aqua dest.; Parafuchsin (E. Leitz, Bln.) zur Bereitung des Schiffschens Reagenses; Eisenhämatoxylinlösung nach Heidenhain (Merck); Giemsa-Orig.-Stammlösung (Hollborn, Lpzg.) 1:30 in aqua dest.; Thionin (Merck); Sudan III, gesättigte Lösung in Äthylalkohol. Von Fermenten kamen zur Verwendung: Diastase (Merck) in Phosphatpuffer mit p<sub>H</sub> 6,8; Trypsin (Merck) in Phosphatpuffer mit p<sub>H</sub> 8,6. Als Redox-Indicatoren dienten: Thionin (Merck) 1:5000, Brillant-Kresylblau (Merck)<sup>2</sup> 1:5000, Methylenblau (Merck) 1:10000 in Leitungswasser oder Phosphatpufferlösung mit p<sub>H</sub> 6,8; Nilblausulfat A (Grübler, Stuttg.) und Janusgrün B (I. G. Farben, Leverk.) 1:10000 in Leitungswasser; Amethystviolett (Bayer) und Methylenviolett (Hollborn, Lpzg.) 1:5000 in Leitungswasser oder Phosphatpufferlösung mit p<sub>H</sub> 6,8; Neutralrot (Merck) 1:5000 in Phosphatpufferlösung mit p<sub>H</sub> 6,6—6,8; 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (Merck), wenn nicht anders angegeben,

<sup>1</sup> Methylviolett wurde durch Ausschütteln mit Chloroform aus der Lösung entfernt.

<sup>2</sup> Dieses Brillant-Kresylblau ist nach Untersuchungen von DRAWERT u. METZNER (1955) am besten als Redoxindicator geeignet, weil es im Gegensatz zu anderen Präparaten nahezu frei von Nilrot ist.

0,1%ig in Leitungswasser; zur Durchführung der Nadireaktion dienten  $\alpha$ -Naphthol (Merck) und Dimethyl-p-phenylendiamin (Merck); p-Phenylendiamin (Kahlbaum) 0,5%ig in Leitungswasser.

Die Fixierungszeit betrug meist 30 min. Die Ausführung der Feulgenreaktion geschah im wesentlichen nach den allgemeinen Vorschriften (JANKE 1946): Nach der Fixierung in absolutem Alkohol (dieser hatte sich günstiger als 96%iger erwiesen) wurden die Blaualgen und die als Kontrolle dienenden Epidermishäutchen von *Allium cepa* 10 min in n-HCl bei 60°C hydrolysiert und nach kurzem Waschen in die mit Aktivkohle völlig entfärbte (LILLIE 1951) fuchsin-schweflige Säure gebracht. Gleichzeitig liefen stets Kontrollen von nichthydrolysiertem Material mit. Nach 3stündiger Färbezeit in dem Schiffschens Reagens wurde 3 mal je  $\frac{1}{4}$  Std in SO<sub>2</sub>-haltigem Wasser und  $\frac{1}{4}$  Std in aqua dest. gespült. Weitere in der vorliegenden Arbeit angewandte Färbeverfahren sind die HCl-Giemsamethode (PIEKARSKI 1937 und ROBINOW 1942), die Färbung mit Methylenblau u. Toluidinblau (1 Std auf dem Objektträger) nach vorangegangener Hydrolyse (10 min) in n-HCl bei 60°C, mit Thionin + Thionylchlorid (DE LAMATER u. HUNTER 1951), mit Methylgrün (v. PLOTHO 1940, POLLISTER u. LEUCHTENBERGER 1949, KURNICK 1950) und anschließende Spülung in n-Butylalkohol (KURNICK 1955) sowie die Färbung mit Pyronin bzw. Methylgrünpyronin (BRACHET 1940). Die mikroskopische Beobachtung erfolgte in Leitungswasser. Die Phosphatnachweise nach MACALLUM (siehe WEIL) und die Methode von SERRA und LOPEZ (GLICK 1949) wurden nach Vorschrift ausgeführt. Zur Fällung des Phosphats als Silberphosphat (BRINGMANN 1952) benutzte ich eine AgNO<sub>3</sub>-Lösung. Bei der Ausführung der Nadireaktion hielt ich mich an die Angaben von PERNER (1952), jedoch wurde  $\alpha$ -Naphthol erst in wenig 96%igem Äthylalkohol gelöst und dann mit dest. Wasser aufgefüllt. Die Nadi- und die TTC-Reaktion wurden im Dunkeln durchgeführt. Da das in die Zellen eingedrungene TTC durch die Einwirkung des Lichtes unter dem Mikroskop relativ schnell reduziert wird, beziehen sich die angeführten Ergebnisse auf das Färbungsbild sofort nach der mikroskopischen Einstellung des Präparates. — Weitere methodische Angaben werden — soweit notwendig — noch bei den einzelnen Versuchen erwähnt.

## II. Versuchsergebnisse

### 1. Die metachromatischen Körperchen (met. K.)

In den fixierten Fäden aller für die Untersuchungen herangezogener Cyanophyceenarten traten nach Färbung mit Methylenblau, Toluidinblau und Neutralrot ein oder mehrere intensiv gefärbte Granula verschiedener Größe in den Zellen in Erscheinung. Aus ihrer Färbbarkeit mit Methylenblau + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nach MEYER und ihrer Metachromasie mit Toluidinblau war zu ersehen, daß es sich dabei um die in der Literatur als „Metachromatin“- oder „Volutinkörperchen“ bezeichneten Gebilde handelte. Daneben waren in jüngeren Zellen auch weniger stark gefärbte Strukturen im zentralen Bereich des Plasmas zu erkennen. In älteren Zellen schienen die met. K. die einzigen basophilen Einschlüsse im Plasma zu sein. Sie waren auch in ungefärbten Zellen oft gut als lichtbrechende Granula zu erkennen, und ihre Anfärbung konnte im Mikroskop verfolgt werden. Im Phasenkontrast erschienen sie heller als das sie umgebende Plasma. Es muß sich also um präformierte Gebilde der Zelle handeln (vgl. auch HERBST 1953, 1954).

a) Die stoffliche Natur der metachromatischen Körperchen

α) Versuche zum Nachweis von Desoxyribonucleinsäure (DNS)

Nach Durchführung der Feulgenschen Nuclealreaktion blieben an Stelle der met. K. auch nach Variierung der Hydrolysezeit und Anwendung verschiedener Fixierungsmittel nur helle substanzfrei erscheinende Flecken übrig. Nur nach Fortlassung der Hydrolyse und Anwendung eines nicht wasserklaren, sondern gelblichen Schiffschens Reagenses wiesen einige der met. K. eine hellrote Färbung auf. Teilweise bewirkte aber auch hier bereits die schweflige Säure des Schiffschens Reagenses eine Auflösung der met. K.

Die Unbeständigkeit der met. K. in verdünnten Säuren ist bekannt, deshalb wurde vielfach die Methylgrünfärbung zum Nachweis von DNS bei Cyanophyceen angewandt (BRINGMANN 1950, v. ZASTROW 1953, HERBST 1953, 1954, BISWAS 1953).

Um das Verhalten echter Kerne bei der Methylgrünfärbung mit dem der met. K. vergleichen zu können, färbte ich auch Epidermishäutchen von *Allium cepa*. Die Kerne der Zwiebelzellen färbten sich stark, das Plasma nur leicht blaugrün. Nach Waschen mit Butanol (KURNICK 1955) war das Plasma nahezu farblos, die Kerne behielten ihre Färbung. Anders verhielten sich die Cyanophyceen. Die met. K. und das Plasma nahmen den Farbstoff auf; aber nach Differenzierung mit Butanol entfärbten sich die Zellen vollständig. Auf Grund dieses unterschiedlichen Verhaltens erschien es nicht ratsam, die Methylgrünfärbung zum Nachweis von DNS bei Cyanophyceen anzuwenden.

Eine weitere Möglichkeit, die Auflösung der met. K. durch Säuren zu verhindern, bestand darin, der Hydrolyse eine Behandlung mit Lanthansalz voranzustellen. — Nach dieser Methode war BRINGMANN (1950) die Feulgenreaktion bei Lyngbyen gut gelungen. — Bei Anwendung dieses Verfahrens blieben die met. K. nach der Hydrolyse zwar erhalten; aber trotz Verlängerung der Hydrolysezeit und mehrstündigen Aufenthaltes der Fäden in dem Schiffschens Reagens erwiesen sich die met. K. als feulgennegativ.

Es kann somit wohl als bewiesen gelten, daß die met. K. keine DNS enthalten und als Kernäquivalente nicht in Frage kommen.

β) Versuche zum Nachweis von Ribonucleinsäure (RNS)

Zum Nachweis von RNS konnte nur die Pyroninfärbung (BRACHET 1940) angewandt werden. KURNICK (1952) weist darauf hin, daß nur mit Pyronin Y einwandfreie Ergebnisse erzielt werden können. Da mir dieser Farbstoff nicht zur Verfügung stand, prüfte ich einige andere Pyronine auf ihre Verwendbarkeit. Mit Pyronin stand. Bayer färbten sich die Nucleoli von Zwiebelepidermiszellen intensiv rot an, während das Plasma nur einen rosa Schimmer aufwies. Bei Cyanophyceen färbte sich aber die

ganze Zelle sehr stark. Es war deshalb nicht möglich, eine Aussage über Vorkommen von RNS zu treffen.

Die Anwendung einer nach Vorschrift (siehe BRACHET 1942) hergestellten Rinderpankreas-Bouillon, die Ribonuclease enthalten soll, hob die Basophilie der met. K. auf. Die Spezifität dieses Reagenses erschien aber fraglich. Deshalb muß die Frage, ob in den met. K. RNS enthalten ist, unbeantwortet bleiben.

#### γ) Nachweis von Phosphat

Die MACALLUM-Reaktion und die Methode von SERRA und LOPEZ zum Nachweis von organischem Phosphat ergaben keine Färbung der met. K. Die stark sauren Reagentien, die bei diesen Nachweisreaktionen angewendet werden, hatten die met. K. zerstört. Es waren nur helle Flecken an Stelle der met. K. im Plasma der Zellen zu erkennen. Im Umkreis dieser hellen Flecken war das Plasma aber recht intensiv blau gefärbt (Molybdänblau). Das übrige Plasma wies eine schwache Blaufärbung auf. Zellen, die keine met. K. besaßen hatten, färbten sich homogen schwach bläulich an. Die starke Blaufärbung um die hellen Flecken herum konnte demnach nur durch Phosphat, das von den met. K. in das Plasma diffundiert war, verursacht worden sein. Bei Behandlung fixierter Cyanophyceen mit  $\text{AgNO}_3$  trat sofort nach dem Eindringen der Silbernitratlösung in die Zellen eine Fällung in den met. K. ein, die im Mikroskop verfolgt werden konnte. Schon BRINGMANN (1952) hat in den met. K. Phosphat als Silberphosphat nachgewiesen. Diese Beobachtungen sprechen wohl für die Anwesenheit von Phosphat in den met. K.

#### δ) Versuche zum Nachweis von Lipoiden, Kohlenhydraten und Eiweißen

Mit  $\text{OsO}_4$ -Dämpfen konnte keine Schwärzung der met. K. festgestellt werden. Desgleichen färbten sie sich nicht mit Sudan III oder Indophenolblau (DIETRICH 1908).

Bei Behandlung lebender sowie fixierter Cyanophyceen mit Jod-Jodkalium blieben die met. K. farblos. Diastase hob ihre Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen nicht auf und bewirkte keine Veränderung des Phasenkontrastbildes der Körperchen.

Pepsin war zum Nachweis von Eiweißen unbrauchbar, da dieses Ferment nur im stark sauren  $\text{pH}$ -Bereich wirksam ist. Eine Aufhebung des hellen Phasenkontrastbildes der met. K. nach Behandlung mit Trypsin, wie es BRINGMANN (1950) angibt, konnte ich nicht beobachten. Die Ninhydrin- und die Biuretreaktion gaben negative Resultate. Nach beiden Reaktionen waren an Stelle der met. K. wieder nur substanzfrei erscheinende helle Flecken übrig.

In den met. K. lassen sich also mit den benutzten Reagentien keine Lipide, kein Glykogen und keine Eiweiße nachweisen.

b) *Abhängigkeit des Vorkommens von metachromatischen Körperchen vom Lebenszustand und der Ernährung der Zellen*

Während die Fäden junger, aber nur langsam wachsender Kulturen von *Anabaena variabilis* und *Cylindrospermum licheniforme* viele große met. K. je Zelle besaßen, waren in den Zellen junger, lebhaft wachsender Kulturen mehrere kleine met. K. vorhanden. Sehr große met. K. traten vor allem in den Zellen von Kulturen auf, die trotz ausreichend vorhandener Nährstoffe kein Wachstum zeigten. In älteren Zellen von Kulturen, die offensichtlich unter Nährstoffmangel litten, waren keine met. K. vorhanden.

Verschiedene Kulturversuche ergaben, daß das Vorkommen der met. K. vor allem vom Phosphatgehalt des Nährmediums abhängig ist und daß es sich nicht um lebensnotwendige Zellorganelle handeln kann.

*Anabaena variabilis* wurde auf Nähragar, dem kein Phosphat zugesetzt worden war, gebracht. Am 15. Tage nach dem Beimpfen der Platten besaßen nur noch wenige Fäden met. K., während die untersuchten Fäden der Mutterplatte (Knop-Agar) und die einer gleichaltrigen Kontrollplatte alle mehrere große met. K. enthielten. Am 25. Tage nach der Beimpfung waren alle untersuchten Fäden der Platten ohne Phosphatzusatz frei von met. K. In den Zellen waren aber sehr viele Cyanophycinkörnchen vorhanden. Die *Anabaena*-Mangelkulturen verkümmerten von da an sehr rasch.

Oscillatorien, in flüssigem Medium ohne Phosphat gezogen, hatten am 30. Tage nach der Beimpfung der Schalen ebenfalls keine met. K. mehr, während im Kontrollversuch mit Phosphat viele met. K. vorkamen. Auch nach 4 Monaten waren die bei Phosphatmangel kultivierten Oscillatorien ohne met. K. noch am Leben. Sie schienen anspruchsloser zu sein als *Anabaena*.

c) *Die Färbung der metachromatischen Körperchen mit basischen Farbstoffen*

Besonders auffällig war die Erscheinung, daß die größeren met. K. im gefärbten Zustand im optischen Schnitt stets die Form von Ringkörpern zeigten. Auch GETTLER 1926, POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY 1929 u. a. (s. DRAWERT 1949) haben diese Beobachtung gemacht. Sie schreiben den met. K. deshalb eine Zweischichtigkeit zu. Ungefärbte große met. K. ließen nach ihrem Aussehen im Phasenkontrast nie auf eine Zweischichtigkeit schließen. Sie erschienen einheitlich heller als das sie umgebende Plasma. Eine Größenzunahme der met. K. bei der Färbung ist des öfteren beschrieben worden (s. DRAWERT 1949). Diese Beobachtungen konnten durch Messungen mit einem Schraubenocularmikrometer an met. K. von *Anabaena variabilis* bestätigt werden (Tab. 1).

Da nach Ansicht GUILLIERMONDS (1925—1933) die met. K. Vacuolen sein sollen, deren Inhalt, das „Metachromatin“, durch basische Farbstoffe ausgefällt wird, könnte man das Auftreten gefärbter met. K. als Ringe und ihre Größenzunahme so erklären, daß der Ring die ausgefällte Verbindung und der „Kern“ die übrigbleibende Flüssigkeit darstellen.

Gegen diese Vorstellung sprechen aber folgende Beobachtungen: Bei der Färbung lebender Cyanophyceenzellen mit Methylenblau war im Mikroskop deutlich zu erkennen, wie ein großer Teil des zuerst nur im Plasma vorhandenen Farbstoffes nach einigen Sekunden, wie durch einen Magnet angezogen, an die met. K. wanderte. Der Farbstoff drang in die met. K. nicht ein, sondern lagerte sich als eine Hülle um diese herum. Im optischen Schnitt erschien diese Hülle als Ring. Die so gefärbten met. K. gaben wie zuvor ein helles Phasenkontrastbild. Ein dunkler Ring

Tabelle 1. Durchmesser der metachromatischen Körperchen von *Anabaena variabilis* im ungefärbten und gefärbten Zustand.

(Färbung mit Methylenblau und Differenzierung mit 1%  $H_2SO_4$ ; Maßangabe in Teilstriichen des Mikrometers. Die angegebenen Zahlen stellen Mittelwerte aus mehreren Messungen dar)

Ungefärbt Hellfeld	Ungefärbt Phako	Gefärbt ohne $H_2SO_4$ Hellfeld	Gefärbt + $H_2SO_4$ Hellfeld
32,9	33,0	39,8	50,1
29,0	28,2	35,2	37,2
23,0	23,0	28,7	32,9
22,9	22,5	30,0	33,6

umgab den hellen „Kern“. Wurde das Präparat dann durch Vaselineumrandung des Deckgläschens luftdicht abgeschlossen und der Farbstoff durch die lebende Zelle reduziert, waren nach etwa 20 min die Farbstoffringe verschwunden. Die met. K. lagen wie vor der Färbung unbeschädigt und unverändert in der Zelle.

Um eine Fällungsreaktion in den met. K. kann es sich demnach nicht handeln, denn der Farbstoff war, wie erwähnt, in die Körperchen überhaupt nicht eingedrungen. Dieses ergab sich auch aus der Beobachtung, daß das Phasenkontrastbild des „Kernes“ gefärbter met. K. die gleiche Helligkeit aufwies wie das eines ungefärbten Körperchens. Eine Aufhellung des Phasenkontrastbildes trat erst nach Zugabe von  $H_2SO_4$  ein.

Daß die met. K. selbst nach Zugabe von  $H_2SO_4$  ihre Färbung noch behalten und sich nach Zufügung von KOH entfärben, beruht, wie DRAWERT (1949) festgestellt hat, darauf, daß sie einen sehr niedrigen IEP haben. Die met. K. sind stets negativ geladen, so daß es naheliegend ist anzunehmen, daß basische Farbstoffe an der Oberfläche der met. K. elektrosorptiv festgehalten werden.

Alle untersuchten basischen Farbstoffe wurden, selbst wenn sie nur in Spuren vorhanden waren, sowohl in lebenden wie in fixierten Zellen immer von den met. K. angelagert. Die kleinen met. K. erschienen im Hellfeld oft einheitlich durchgefärbt. Doch auch sie gaben ein helles Phasenkontrastbild, woraus zu ersehen ist, daß sich auch hier der Farbstoff nur an der Oberfläche der Körperchen zu befinden scheint.

## 2. Die desoxyribonucleinsäurehaltigen Strukturen der Cyanophyceenzelle

Während sich die met. K. nicht nach Feulgen färben ließen, traten bei dieser Reaktion Strukturen in den Cyanophyceenzellen zutage, wie sie in letzter Zeit DRAWERT (1949), DRAWERT u. METZNER (1956), v. ZASTROW (1953), CASSEL u. HUTCHINSON (1954) und DREWS u. NIKLOWITZ (1956) beschrieben haben. Die Feulgensche Nuclealreaktion gelang nur, wenn das Schiffsche Reagens völlig farblos war.

Für die Gesamtheit der feulgenpositiven Strukturen der Blaualgenzelle soll hier die alte Bezeichnung „Chromidialapparat“ verwendet werden. Es kann kein Zweifel mehr bestehen, daß dieser die Aufgaben des Kernes erfüllt. Die met. K. sind davon streng zu trennen. Der Chromidialapparat liegt im zentralen Bereich des Plasmas. Er kann bei den einzelnen Arten und auch bei ein und derselben Art je nach Alter der Zellen recht unterschiedlich gestaltet sein. Bei *Anabaena variabilis* aus alten Kulturen lag er in der Mitte der Zelle als ein ovales, einem normalen Kern recht ähnliches Gebilde, während die Heterocysten ein quer durch die Zelle verlaufendes feulgenpositives granuliertes Band aufwiesen. In jungen Fäden derselben Art bestand der Chromidialapparat dagegen aus einem aufgelockerten, aus Fäden und Knoten sich zusammensetzenden Gerüstwerk. Die Heterocysten boten das gleiche Bild wie in den alten Kulturen. Wie *Anabaena variabilis* verhielten sich die anderen untersuchten *Anabaena*-, sowie *Nostoc*- und *Cylindrospermum*-Arten. *Scytonema*-, *Tolypothrix*- und *Calothrix*-Arten zeigten immer mehr das Gerüstwerk der jungen *Anabaena*-Zellen, allerdings noch aufgelockerter. Bei den *Oscillatoria*-Arten war der Chromidialapparat stark körnig und aufgelockert, quer über die Zellmitte verteilt oder mehr in der Längsachse der Zelle angeordnet. Manche *Oscillatoria*-Arten zeigten auch mehr das für *Lyngbya aerugineo-coerulea* und *L. amplivaginata* typische Bild. Hier waren meist nur zwei, stets in der Mitte der Zelle gelegene Granula zu erkennen, die auch die Form eines achsialen Stabes annehmen konnten. Die met. K. lagen bei diesen Formen im Gegensatz zu den zentralen „Nuclealgranula“ immer an den Polen der Zelle. Nach der Feulgenreaktion waren an Stelle der met. K. nur helle Flecken zu erkennen. — Auf Abbildungen kann verzichtet werden, da die eigenen Befunde mit den von CASSEL u. HUTCHINSON (1954) gebrachten Bildern übereinstimmen. Die Kontrollversuche ohne Hydrolyse ergaben keine Färbung des Chromidialapparates.

Eine Färbung des Chromidialapparates wurde ferner erzielt mit Hämatoxylin nach Heidenhain, Methylenblau, Toluidinblau, GiemsaFarblösung sowie Thionin + Thionylchlorid nach vorangegangener Hydrolyse (10 min) in n HCl bei 60°C. Die Formen des Chromidialapparates waren bei diesen Färbungen jeweils die gleichen wie bei der Feulgenreaktion.

Besonders intensiv und deutlich färbte sich der Chromidialapparat in unfixierten Zellen mit Nilblau und Janusgrün. In fixierten Zellen gelangen diese Färbungen nicht.

Eine Zellteilung im Phasenkontrast zu verfolgen, gelang mir nicht. Aus den Färbungsbildern konnte nur entnommen werden, daß der Chromidialapparat bei der Zellteilung halbiert wird. Wenn er als mehr oder weniger körniges, lockeres Gerüstwerk in der Zelle vorlag, konnte auch hier die Beobachtung gemacht werden, daß er vor der endgültigen Ausbildung der Tochterzellen die Form einer Spindel annimmt. In den Fällen, wo der Chromidialapparat eine kompakte zusammenhängende Form besaß (z. B. alte *Anabaena*-Fäden), waren keine Teilungszustände der Zellen zu erkennen. Die lockere Verteilung der DNS wies auf eine stete Teilungsbereitschaft der Zellen hin. Bei den untersuchten *Lynghya*-Arten wird die neue Wand vermutlich zwischen den beiden „Nuclealgranula“ eingezogen.

### 3. Die Cyanophycinkörnchen

Als ein weiterer granulärer Bestandteil der Cyanophyceenzelle sind die Cyanophycinkörnchen zu nennen. Diese Körnchen, die als stark lichtbrechende Gebilde von unregelmäßiger Form in den Cyanophyceenzellen oft vorkommen und kaum mit anderen Zelleinschlüssen verwechselt werden können, färbten sich mit keinem der für die vorgenannten Untersuchungen verwendeten Farbstoffe. In besonders großer Zahl kamen sie bei *Anabaena variabilis* in den Zellen vor, die keine met. K. enthielten. Die Fäden degenerierter Kulturen besaßen meist auch viele Cyanophycinkörnchen. Junge Zellen frischer Kulturen enthielten im allgemeinen, wenn gutes Wachstum stattfand, keine oder nur sehr wenig Cyanophycinkörnchen.

### 4. Diskussion der Ergebnisse

Es konnte erneut bestätigt werden, daß die Cyanophyceenzelle normalerweise eine im zentralen Bereich des Plasmas gelegene Substanz, welcher infolge ihres DNS-Gehaltes Kernfunktion zukommt und metachromatische Körperchen, die keine DNS enthalten, besitzt. Die als Chromidialapparat bezeichnete zentrale Substanz ist immer vorhanden, die metachromatischen Körperchen können fehlen.

Der Chromidialapparat kann, wie in letzter Zeit auch v. ZASTROW (1953) festgestellt hat, je nach Alter und Art der Cyanophyceen verschiedene Formen haben. In älteren mit basischen Farbstoffen gefärbten Zellen ist er oft schwer zu erkennen, weil er durch die met. K., die dort meist besonders groß sind, verdeckt wird. Im einzelnen besteht der Chromidialapparat der untersuchten Arten aus 2 bis mehreren kleinen Körnchen, die entweder direkt oder durch Fäden miteinander verbunden sind. Zahlreiche Autoren, u. a. POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY (1929),

GUILLIERMOND (1926, 1933), DELAPORTE (1939/40), DRAWERT (1949), CASSEL u. HUTCHINSON (1954) sowie DREWS u. NIKLOWITZ (1956) haben die feulgenpositiven Strukturen der Cyanophyceenzelle so beschrieben.

Bei verschiedenen Gattungen, z. B. *Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, tritt mit dem Altern der Zellen eine Verdichtung in dem Chromidialapparat ein. Die einzelnen Granula sind dicht zusammengedrängt. Dadurch gewinnt der Chromidialapparat eine kompakte, oft ovale Form und ähnelt einem echten Ruhekern. Zellen, die einen so beschaffenen Chromidialapparat besitzen, lassen keine Teilungsstadien erkennen. Das aufgelockerte, körnige Gerüstwerk, das den Chromidialapparat in jüngeren Zellen charakterisiert, könnte demzufolge mit einem Teilungskern verglichen werden.

Die Beobachtungen von BRINGMANN an *Lyngbya amplivaginata* und *L. aerugineo-coerulea* konnten nicht bestätigt werden. Wie alle übrigen von mir untersuchten Arten enthalten auch die genannten Lyngbyen einen Chromidialapparat und met. K. Der Chromidialapparat besteht hier aus 2 Granula und befindet sich in der Mitte der Zelle. Die met. K. sind an den Polen der einzelnen Zellen gelegen. Nach der Feulgenschen Nuclealreaktion waren, wenn die Fäden zuvor nicht mit  $\text{LaNO}_3$  behandelt worden waren, an Stelle der met. K. nur helle substanzfrei erscheinende Flecken zu erkennen. Die „Nuclealgranula“ waren dunkelrot gefärbt. Eine Lanthannitratbehandlung verhinderte die Auflösung der met. K. durch die Salzsäure. Sie reagierten aber nicht mit dem Schiffschens Reagens. Auch in diesem Falle wiesen die „Nuclealgranula“ die Rotfärbung auf. — Für das Gelingen der Feulgenreaktion ist eine wasserklare fuchsin-schweflige Säure wichtigste Voraussetzung. Mit Aktivkohle wurde die vollständige Entfärbung des Reagenses erzielt (LILLIE 1951). Wenn das Schiffschens Reagens mit einer gelblichen Färbung angewendet wurde, färbten sich in den zuvor mit  $\text{LaNO}_3$  behandelten Fäden die met. K. hellrot an. Die „Nuclealgranula“ waren nicht zu erkennen. Es wäre möglich, daß BRINGMANN (1950) nicht völlig farblose fuchsin-schweflige Säure benutzt hat und ihm deshalb bei seinen lichtmikroskopischen Untersuchungen die Anwesenheit der Nuclealgranula entgangen ist.

Auch nach HERBST (1953, 1954) verhalten sich die met. K. feulgen-negativ. Auf Grund einer positiven Methylgrünfärbung betrachtet er sie aber doch als Kernäquivalente. Die Methylgrünfärbung ist zum Nachweis von DNS bei Cyanophyceen aber nach meinen Untersuchungen nicht geeignet (vgl. auch DREWS u. NIKLOWITZ 1956). Die Färbung der met. K. mit Methylgrün beruht vermutlich nur auf der Fähigkeit dieser Körperchen, basische Farbstoffe an der Oberfläche anzureichern. Die von HERBST (1954) beobachteten Teilungszustände der met. K., die er ferner als Beweis für die Kernfunktion dieser Granula heranzieht, können aber wohl verschiedene Ursachen haben.

Die met. K., die keine DNS enthalten, bestehen in der Hauptsache aus Phosphat, das sich in Säuren, Laugen und heißem Wasser löst. Lipide und Kohlenhydrate besitzen sie, wie in letzter Zeit auch DREWS u. NIKLOWITZ (1956) festgestellt haben, nicht. Es konnten von mir auch keine Eiweiße in ihnen nachgewiesen werden. DREWS u. NIKLOWITZ haben jedoch außer Phosphat auch Proteine in den met. K. (die Autoren sprechen von „großen Granula“) gefunden. Phosphat ist ferner von BRINGMANN (1950, 1952) in seinen „Karyoiden“ nachgewiesen worden. Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei den von BRINGMANN beschriebenen „Kernäquivalenten“ um met. K. handelt.

Da das Vorkommen von met. K. vom Phosphatgehalt des Nährmediums abhängig ist (siehe auch NAGEL 1948), handelt es sich bei diesen Körperchen der Cyanophyceen wohl wie bei bestimmten Granula der Bakterien (KRÜGER-THIEMER u. LEMBKE 1954) um Phosphatreserven, die unter ungünstigen Lebensbedingungen aufgezehrt werden.

Wie aus einem späteren Abschnitt hervorgehen wird, besitzen die met. K. der Cyanophyceen keine nachweisbaren Redox-Eigenschaften.

GUILLEMOND bezeichnet die met. K. als Vacuolen. Von Vacuolen sollte aber nicht gesprochen werden, denn es könnte dann leicht eine Verwechslung mit „echten Vacuolen“ der Cyanophyceen vorkommen, wie sie in älteren Zellen bekanntlich mitunter auftreten (DRAWERT 1949, v. ZASTROW 1953, DRAWERT u. METZNER 1956), die aber nicht mit Vacuolen höher organisierter Pflanzen vergleichbar sind. v. ZASTROW (1953) vermutet, daß sie ihre Entstehung dem Übergang des zentralen Plasmas vom Gel- in den Solzustand zu verdanken haben. In diesen Vacuolen, die sich mit Methylenblau, Toluidinblau und Neutralrot färben, kann es zu Ausfällungen durch den Farbstoff kommen. Die dadurch entstehenden Granula dürfen nicht mit met. K. verwechselt werden (DRAWERT 1949).

Die Frage, ob in der Cyanophyceenzelle auch RNS vorkommt, kann aus den eigenen Untersuchungen nicht beantwortet werden. BISWAS (1956) ist es aber gelungen, DNS und RNS von *Nostoc muscorum* zu isolieren, und er konnte chromatographisch den Beweis erbringen, daß die DNS der Cyanophyceen mit der höher organisierter Pflanzen identisch ist und auch die RNS nicht vom Normaltyp abweicht. DREWS u. NIKLOWITZ haben in *Phormidium uncinatum* diffus verteilte RNS im zentralen Plasma nachgewiesen. Die DNS-haltigen Granula sind dort von RNS-haltigem Plasma umgeben. Die Anwendung spezifischer Fermente wird nötig sein, um Klarheit hinsichtlich der Verteilung der RNS in anderen Arten zu schaffen.

Cyanophycinkörnchen waren als stark lichtbrechende, unregelmäßig gestaltete Granula in besonders großer Zahl in alternden Zellen, in Zellen ohne met. K. und in Dauerzellen vorhanden. Junge, wohlgenährte Zellen besaßen in der Regel keine oder höchstens sehr wenig Cyanophycin-

körnchen. Sie scheinen also besonders dort aufzutreten, wo infolge ungünstiger Lebensbedingungen Veränderungen in den Zellen einsetzen. v. ZASTROW (1953) berichtet von einer Zunahme dieser Körnchen im extrem sauren und alkalischen Bereich. Mit den eigenen Befunden läßt sich diese Beobachtung gut in Einklang bringen, denn weder bei extrem alkalischer noch bei extrem saurer Reaktion liegen gute Lebensbedingungen für Cyanophyceen vor.

Die Cyanophycinkörnchen sollen aus Proteinkristalloiden (GEITLER 1932) oder Lipoproteiden (siehe DRAWERT 1949) bestehen. Wieweit es sich um reine Degenerationsprodukte oder um Reservestoffe handelt, soll hier nicht weiter untersucht werden.

### 5. Das Verhalten einiger Cyanophyceen gegenüber Redox-Indicatoren

#### a) Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

Das bei der Reduktion von 2,3,5-TTC entstehende Formazan ist stark lipophil (RIED 1952), deshalb gehen in der Frage nach dem Ort in der Zelle, an dem die Reduktion erfolgt, die Meinungen der Autoren auseinander. Vertreter der einen Richtung, zu der BIELIG, KAUSCHE u. HAARDICK (1949), BRINGMANN (1951, 1952 b), PRENNER, v. PRITZWITZ u. GAFFRON (1952), HAHN (1952), DAVIS, WINTERSCHIED, HARTMANN u. MUDD (1953), SALL u. MUDD (1955) gehören, sehen in den mit Formazan sich anfärbenden Zellbestandteilen die Reduktionsorte selbst. DRAWERT (1953, 1954) u. ZIEGLER (1953) vertreten aber die Auffassung, daß das Formazan nicht unbedingt Reduktionsorte anzeigt, sondern sich auf Grund seiner starken Lipophilie in Lipoiden anreichert.

Nachdem Cyanophyceenfäden eine gewisse Zeit in einer TTC-Lösung gelegen hatten, konnten über die einzelnen Zellen unregelmäßig verteilte, rot gefärbte Granula festgestellt werden. Nach einem längeren Aufenthalt in dem Reagens traten neben diesen Granula oftmals große rote Formazankristalle auf. Die met. K. waren immer ungefärbt. Wie phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen ergaben, handelt es sich um die Anfärbung präformierter Granula, die bei Hellfeldbeobachtung meist nur schwer von den übrigen Einschlüssen der Cyanophyceenzellen zu unterscheiden waren. In besonders großer Zahl kamen diese Granula bei einer *Nostoc*-Art vor. Sie waren bei dieser Art auch im normalen Lichtmikroskop deutlich als lichtbrechende Körnchen zu erkennen. Ihre Anfärbung mit Formazan konnte deshalb im Mikroskop verfolgt werden. Besaßen die Zellen viele dieser Granula, konnte kaum eine Kristallbildung beobachtet werden. Bei *Anabaena variabilis* dagegen waren nur wenig Granula, aber oft sehr große Formazankristalle in den Zellen vorhanden.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Granula viel Lipide enthalten, in denen das Formazan gespeichert werden kann. Sind nur

wenige Granula vorhanden, so fällt das überschüssige Formazan in Form von Kristallen aus. *Die Stärke der Formazanbildung ist von der Anzahl der vorhandenen Granula unabhängig.*

Der physiologische Zustand der Zellen ist für das Zustandekommen der TTC-Reduktion von großer Bedeutung, wie aus einer Reihe von Beobachtungen hervorging und auch zu erwarten war. Das Alter und der Lebenszustand der Zellen bzw. Fäden spielen dabei eine Rolle, wie Tab. 2 für *Anabaena variabilis* belegt.

Tabelle 2. *Das Auftreten von Formazan in den vegetativen Zellen von Anabaena variabilis in Abhängigkeit vom Alter und vom Zustand der Fäden.*  
(Angabe der Zeit vom Einlegen der Fäden in TTC bis zum Sichtbarwerden des Formazans)

	Zeit in Minuten
Keimende Dauerzellen und die daraus hervorgegangenen ersten Zellen . . . . .	20
Junge, zarte Fäden 3—4 Wochen alter Kulturen . . . . .	keine Reduktion
Gut wachsende Kulturen (2—3 Monate alt) . . . . .	30—35
Zellen mit Degenerationserscheinungen . . . . .	55—60

Ferner war es, wie auch DREWS (1955) festgestellt hat, mitunter von Bedeutung, in welchem Lösungsmittel das TTC geboten wurde. So reduzierte z. B. *Anabaena variabilis* zeitweilig nicht das TTC, wenn dieses in aqua dest. anstatt in Leitungswasser zur Anwendung kam. Daß diese Erscheinung ebenfalls nur auf Veränderungen des physiologischen Zustandes der Zellen zurückzuführen ist, geht daraus hervor, daß bei Untersuchungen zu einem anderen Zeitpunkt *Anabaena variabilis* in aqua dest. gelöstes TTC genau so gut reduzierte wie solches in Leitungswasser.

Ein eigentümliches Verhalten gegenüber TTC konnte bei einer noch nicht näher bestimmten *Anabaena*-Art beobachtet werden. Die Reduktionskraft dieser Art sank stark ab, wenn die Fäden nach Entnahme aus dem Gewächshaus, wo sie auf *Hydromystria*-Blättern wuchsen, ins Labor gebracht und dort auf ebensolchen Blättern in einem Schälchen mit Wasser aus dem Gewächshausbecken aufbewahrt wurden. Das Reduktionsvermögen von *Cylindrospermum stagnale* veränderte sich dagegen in der gleichen Zeit bei gleicher Behandlung der Fäden nur geringfügig, wie aus Tab. 3 hervorgeht.

Für dieses Verhalten scheinen die anderen Lichtverhältnisse im Laboratorium verantwortlich zu sein. Es ergab sich nämlich, daß nach Übertragung der Fäden aus dem Gewächshaus in einen Raum, in dem wie im Gewächshaus einige Leuchtstoffröhren brannten, keine Abnahme des Reduktionsvermögens auftrat.

Eine Portion *Anabaena*-Fäden aus dem Gewächshaus wurde auf 4 Schälchen verteilt. Die Zellen der frisch entnommenen Fäden reduzierten TTC sehr gut. Zwei der Schälchen blieben im Laboratorium stehen, 2 wurden in die obengenannte, mit Leuchtstoffröhren versehene Kammer gebracht. Bei Untersuchung der Objekte nach 24 Std ergab sich, daß die Fäden aus dem Laboratorium nicht mehr fähig waren, TTC zu reduzieren, wogegen diejenigen aus der Kammer mit Zusatzbeleuchtung das gleiche starke Reduktionsvermögen besaßen wie am Tage zuvor nach der

Entnahme aus dem Gewächshaus. Die Standorte der Schälchen wurden sodann vertauscht. Nach weiteren 24 Std wurde wieder eine Untersuchung vorgenommen. Nun ergab sich, daß die Fäden, die am Tage zuvor kein Formazan mehr bilden konnten (Laboratorium), ihr früheres Reduktionsvermögen wiedergewonnen und die anderen es verloren hatten.

Wahrscheinlich spielen außer dem Licht auch noch andere, unbekannte Faktoren dabei eine Rolle. Die Beobachtungen zeigen aber, wie schon geringfügige Veränderungen des physiologischen Zustandes der Zellen den Ausgang der Untersuchungen beeinflussen und die Ursache unterschiedlicher Ergebnisse sein können.

Tabelle 3. *Abnahme des TTC-Reduktionsvermögens einer Anabaena-Art und von Cyindrospermum stagnale bei Aufenthalt im Laboratorium.*  
(TTC in Leitungswasser gelöst, mikroskopische Beobachtung nach 35 min Verweilen der Fäden in der Lösung)

Zeit des Aufenthaltes im Laboratorium	<i>Anabaena spec.</i>	<i>Cyindrospermum stagnale</i>
Frisch aus dem Gewächshaus	+++	+++
2 Std	++	+++
4 „	++	+++
6 „	+	++
22 „	—	++
48 „	—	++
72 „	—	++

*b) Das Verhalten der Cyanophyceen gegenüber dem Nadiereagens*

Das bei der Nadiereaktion entstehende Indophenolblau ist ebenfalls stark lipoidlöslich, so daß es vielfach als Nachweismittel für Fette benutzt worden ist. Das Reagens wird aber auch zum Nachweis von Oxydasen verwendet. Während PERNER (1952) u. a. aus der Anfärbung mit Indophenolblau auf den Ort der Oxydationsreaktion schließen, wird von anderer Seite (DRAWERT 1953) die Ansicht vertreten, daß diese Schlußfolgerung nicht statthaft ist. Auf Grund der Lipophilie des Indophenolblaus kann über den Ort in der Zelle, an dem dessen Bildung erfolgt, genau so wie beim Formazan, keine Aussage gemacht werden. Die Färbung bestimmter Zellbestandteile mit Indophenolblau bei der Nadiereaktion ist wohl ein sicheres Zeichen für deren Lipoidreichtum, kann aber nicht als Beweis dafür gelten, daß diese Zelleinschlüsse die Rolle von Fermentträgern spielen.

Bei cytologischen Untersuchungen an Cyanophyceen diene das Nadiemisch zum Nachweis von Lipoiden. GUILLIERMOND (1926, 1933) und DELAPORTE (1939/40) beobachteten nach Behandlung einiger Cyanophyceenarten mit diesem Reagens in den Zellen dunkel gefärbte Granula, die, wie GUILLIERMOND angibt, in lebenden Zellen nur schwer sichtbar waren. Als Indicator für Oxydasereaktionen ist das Nadiemisch bei Cyanophyceen von DREWS u. NIKLOWITZ (1956) bei *Phormidium uncinatum* benutzt worden.

In den eigenen Versuchen rief die Behandlung der Cyanophyceen mit dem Nadireagens eine dunkelblaue bis violette Granulafärbung in den Zellen hervor. Die so mit Indophenolblau gefärbten Granula waren, wie aus ihrer Form und Verteilung hervorging, mit den durch Formazan färbaren identisch. Die metachromatischen Körperchen blieben ebenso wie die Cyanophycinkörnchen ungefärbt.

Während in lebenden Zellen die Indophenolblaubildung nicht immer beobachtet werden konnte, sondern sich auch hier eine Abhängigkeit der Reaktion vom jeweiligen physiologischen Zustand der Zellen bemerkbar machte, traten in bereits toten oder durch Formolfixierung bzw. durch Behandlung mit heißem Wasser vor der Einbringung in das Nadigemisch abgetöteten Zellen stets viele dunkelblau oder violett gefärbte Granula auf. Die Zahl dieser Granula war in toten Zellen größer als in lebenden. Es ließ sich aber nicht mit Sicherheit feststellen, ob es sich in toten Zellen durchweg um gefärbte präformierte Granula handelte oder ob neben einer Färbung der bekannten Granula eine Ausfällung des Farbstoffes eingetreten war.

Bei den toten Zellen handelt es sich um eine reine Fettreaktion. In lebenden Cyanophyceenfäden aber ist die Aktivität der Zellen für den Ausgang der Reaktion mit verantwortlich. Ich stellte fest, daß in Zellen von Kulturen, die TTC besonders schnell zu reduzieren vermochten, entweder gar keine Granulafärbung mit Indophenolblau eintrat oder eine sehr lange Reaktionszeit dafür erforderlich war. Auch der umgekehrte Fall konnte beobachtet werden, wie aus Tab. 4 hervorgeht.

Tabelle 4. Vergleich von TTC-Reduktions- und Nadi-Oxydationsvermögen einiger untersuchter Cyanophyceenarten an ein und demselben Versuchstage.  
Auftreten der Granulafärbung nach Minuten

Art	TTC	Nadi
<i>Anabaena variabilis</i> , keimende Dauerzellen, erste vegetative Zellen . . . . .	20	—
<i>Anabaena variabilis</i> (2—3 Monate alt) . . .	35	35
<i>Anabaena</i> spec. . . . .	—	20
<i>Oscillatoria</i> spec. . . . .	—	120
<i>Oscillatoria</i> spec. . . . .	—	85
<i>Oscillatoria</i> spec. . . . .	15	—
<i>Oscillatoria</i> spec. . . . .	—	20

Einen Hinweis auf den Lokalisationsort der Oxydasen, welche die Nadi-reaktion beschleunigen, konnten die Versuche nicht geben.

c) Reduktion von Nilblau A und Janusgrün B  
(fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen)

Auf nähere Angaben über diese beiden Farbstoffe und deren Anwendung als Redox-Indikatoren bei cytologischen Untersuchungen soll hier unter Hinweis auf die Arbeiten von DRAWERT (1952, 1953), DRAWERT u.

GUTZ (1953) und GUTZ (1956) sowie die dort zitierte Literatur verzichtet werden.

Die Färbung kleiner Cyanophyceenwatten erfolgte in Farblösungen, die kurz vor dem Versuch aus einer Stammlösung auf 1 : 10000 mit Leitungswasser verdünnt wurden. Eine Färbezeit von 3—5 min, in der nur die Randfäden der Watten den Farbstoff in sichtbaren Konzentrationen aufgenommen hatten, war am günstigsten. Nach luftdichtem Abschluß durch Vaselineumrandung der Deckgläschen wurden die Präparate in einem geschlossenen Kasten, vor direktem Lichteinfall geschützt, eine Zeit lang liegen gelassen.

Bei Färbung mit Nilblau und Janusgrün traten, wie schon früher erwähnt wurde, Strukturen im zentralen Bereich des Plasmas auf, welche nach Form und Lage als Chromidialapparat angesprochen werden konnten. Bei der oben angegebenen Färbezeit ließen jedoch nur die Randfäden der Watten eine Färbung des Chromidialapparates der Zellen erkennen. Diese Färbung muß aber als postvital angesehen werden. Die Zellen der im mittleren Bereich der Watten gelegenen Fäden wiesen zunächst keine sichtbare Färbung auf. Erst bei fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der unter Luftabschluß gehaltenen Objekte war in den Zellen dieser Fäden eine gelbe Granulafluoreszenz zu erkennen. Diese Granula waren nicht wie die durch Formazan und Indophenolblau färbbaren über die ganze Zelle verteilt, sondern befanden sich nur im zentralen Bereich des Plasmas. Sie waren außerdem auch wesentlich kleiner als jene. Ferner trat die Granulafluoreszenz nur in den Zellen der im Hellfeld keine Färbung zeigenden Fäden auf. In den stark gefärbten, geschädigten Randfäden der Watten war diese Granulafluoreszenz nicht zu beobachten. Die Granulafluoreszenz erlosch, wenn  $H_2O_2$  zugegeben wurde.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Fluoreszenz dieser kleinen Granula nach Färbung mit Nilblau und Janusgrün nicht regelmäßig eintrat. Die einzige Form, die nahezu immer gute Ergebnisse lieferte, war eine *Nostoc*-Art. Regelmäßigere Ergebnisse zeigten auch die Heterocysten, in denen die fluoreszierenden Granula in dem durch feulgenpositive Strukturen gekennzeichneten Mittelstreifen lagen. Nur noch voll vitale Zellen waren in der Lage, die Farbstoffe zu reduzieren. Sowohl Nilblau wie Janusgrün erwiesen sich aber als recht giftig für die Blaualgen. Die guten Ergebnisse mit *Nostoc* sind wohl darauf zurückzuführen, daß die ausgeprägten Gallerthüllen bei dieser Art nur eine langsame Diffusion der Farbstoffe in die Zellen zuließen und so eine zu schnelle Schädigung verhinderten.

Die metachromatischen Körperchen wiesen niemals eine Fluoreszenz auf.

Außer der beschriebenen Granulafluoreszenz war nach Färbung mit Nilblau und Janusgrün auch eine Fluoreszenz des gesamten Plasmas zu beobachten, welche manchmal in den Heterocysten die Fluoreszenz der kleinen Granula überdeckte.

Die Beobachtung der Granulafluoreszenz in den mit Nilblau gefärbten Objekten war oft erschwert durch eine einheitliche Fluoreszenz des ganzen Präparates, die vermutlich vom Nilrot, das als Verunreinigung im Nilblau vorkommt (GUTZ 1956), herstammte. Klarere Bilder lieferte immer die Janusgrünfärbung.

Nicht verwechselt werden darf die hier geschilderte Granulafluoreszenz mit einer anderen, ebenfalls in Form von Granula auftretenden Fluoreszenzerscheinung, die aber nach DRAWERT (mündliche Mitteilung) durch gewisse Veränderungen des Farbstoffes und wohl auch des Plasmas infolge der intensiven Bestrahlung während der Beobachtung hervorgerufen wird. Sie trat nach längerer Beobachtung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop besonders auch in den toten Randfäden auf und war durch  $H_2O_2$  nicht beeinflussbar. Diese Granula waren orange-gelb gefärbt, über die ganze Zelle verteilt und von unregelmäßiger Gestalt. — Außerdem kommt eine orange-gelbe Eigenfluoreszenz nekrotischer Zellen vor, die auch v. ZASTROW (1953) erwähnt. Mitunter konnte nach Färbung mit Nilblau oder Janusgrün auch eine Fluoreszenz der an den Heterocysten von *Cylindrospermum*-Arten sitzenden Bakterien beobachtet werden.

#### d) Diskussion

Außer metachromatischen Körperchen, Cyanophycinkörnchen und desoxyribonucleinsäurehaltigen Strukturen konnten noch zwei weitere Arten von Granula in der Cyanophyceenzelle beobachtet werden. Auf ihr Vorhandensein haben erst die Versuche mit Redox-Indikatoren aufmerksam gemacht, denn diese Granula sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sich im Unterschied zu den bekannten granulären Einschlüssen der Cyanophyceenzelle mit den Oxydations- bzw. Reduktionsprodukten verschiedener Redox-Indikatoren anfärben. Die beiden Granulaarten unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber TTC und dem Nadigemisch einerseits und Nilblau und Janusgrün andererseits sowie durch ihre Größe und unterschiedliche Lage in der Zelle. Die größeren Granula sind über die ganze Zelle verteilt oder treten an den Zellwänden gehäuft auf und färben sich mit dem durch Reduktions- bzw. Oxydationsvorgänge in der Zelle entstehenden Formazan oder Indophenolblau. Die kleineren, nur im zentralen Bereich des Plasmas gelegenen Granula sind erst als gelb fluoreszierende Körnchen im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten, wenn die Zellen in geringen Konzentrationen aufgenommenes Nilblau oder Janusgrün B reduziert haben. Während die größeren Granula im Phasenkontrastmikroskop und in einzelnen Arten auch im normalen Lichtmikroskop ungefärbt zu erkennen waren, konnten die kleinen also nur im gefärbten Zustand wahrgenommen werden.

DREWS u. NIKLOWITZ (1956) wiesen in *Phormidium uncinatum* fünf verschiedene granuläre Einschlüsse nach: 1. im „Centroplasma“ gelegene,

DNS-haltige Granula, 2. im gesamten Plasma vorhandene große Granula, die Phosphat besitzen, 3. im peripheren Bereich des „Centroplasmas“ gelegene, Phosphatide enthaltende Granula, die erst nach Formol-Ca-Fixierung deutlich nachweisbar sind und sich wie die beiden ersten Arten mit Galloxyaninchromalaun färben; schließlich im Bereich der Quer- und Längswände und verstreut auch im „Chromatoplasma“ vorhandene Granula, die sich mit Formazan (Stilben-TC), Indophenolblau (Nadi) und Janusgrün, welches dort zum Diäthylsaffranin reduziert wird, färben. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, daß es sich bei den im Bereich der Zellwände gelegenen Granula um zwei verschiedene Arten handelt: 1. große, strukturiert erscheinende Granula und 2. kleine, stark osmiophile Granula. Die Anfärbung der größeren Granula konnten die Autoren im Lichtmikroskop verfolgen.

Es soll nun versucht werden, die von DREWS u. NIKLOWITZ gefundenen Granula mit den von mir nachgewiesenen zu identifizieren. — Die DNS-haltigen Granula im zentralen Plasma stellen in ihrer Gesamtheit den Chromidialapparat dar. Die großen Phosphatgranula werden in der vorliegenden Arbeit als metachromatische Körperchen bezeichnet. Die 3. Art von Granula, die sich nach DREWS u. NIKLOWITZ mit Galloxyaninchromalaun färbt, muß der Lage und Größenbeschreibung nach mit den von mir beobachteten, mit Leukonilblau und -janusgrün fluorochromierbaren Granula identisch sein. Die mit Formazan und Indophenolblau tingierbaren, strukturierten Granula müßten den von mir gefundenen, auf gleiche Weise färbbaren gleichzusetzen sein. Allerdings konnte ich nicht beobachten, daß sie sich mit Janusgrün färben. Außerdem ist darauf hinzuweisen, daß DREWS u. NIKLOWITZ ein anderes Tetrazoliumsalz, und zwar Stilben-TC, für ihre Untersuchungen benutzt haben. Es blieben nun noch die kleinen, osmiophilen Granula nach DREWS u. NIKLOWITZ sowie die Cyanophycinkörnchen übrig. Die ersten liegen nach DREWS u. NIKLOWITZ in ihrer Größenordnung unter dem Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes, so daß ich sie gar nicht wahrnehmen konnte. Daß die zweiten von DREWS u. NIKLOWITZ nicht erwähnt werden, kann darauf zurückzuführen sein, daß *Phormidium uncinatum* keine Cyanophycinkörnchen besaß. Auch ich konnte diese Körnchen ja meist nur in Zellen, die schon Degenerationserscheinungen zeigten, in größerer Zahl finden.

DREWS u. NIKLOWITZ betrachten die großen, strukturierten Granula als Fermentzentren, da nach ihren Beobachtungen an diesen Granula Janusgrün zum Diäthylsaffranin reduziert wurde und Formazan aus Stilben-TC zuerst an diesen Granula auftrat. Die Autoren halten es darüber hinaus nicht für ausgeschlossen, daß auch die kleinen osmiophilen Granula Fermentträger sind.

Man kann aber die Granulafärbung mit Formazan (TTC) und Indophenolblau nicht als endgültigen Beweis für das Vorhandensein von

Fermenten an diesen Granula ansehen. Bei meinen Untersuchungen handelt es sich in beiden Fällen um stark lipophile Verbindungen, die zunächst nur den Lipoidcharakter der mit diesen Farbstoffen färbbaren Zelleinschlüsse anzeigen. Eine Färbung der größeren Granula mit Janusgrün konnte ich nicht beobachten. Wie ich feststellte, ist die Stärke der Formazanbildung von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen Granula unabhängig; sie richtet sich nach dem physiologischen Zustand der Zellen. Wo die Reduktion des TTC erfolgt, kann also nicht gesagt werden. Es muß auch die Frage nach dem Sitz von Oxydasen offen bleiben.

Nach DRAWERT (1954) ist für die Verteilung eines Farbstoffes das Verhältnis der lipophilen zu den hydrophilen Gruppen der jeweiligen Zellbestandteile oder -einschlüsse und des Farbstoffes verantwortlich. Auf Reduktions- oder Oxydationsorte kann man aus der Farbstoffverteilung nicht ohne weiteres schließen. Es kann deshalb die durch reduziertes Nilblau oder reduziertes Janusgrün bedingte Fluoreszenz der kleinen, im zentralen Plasma gelegenen Granula auch nicht als Beweis für das Vorhandensein von Dehydrasen in diesen Granula angesehen werden. Eine derartige Schlußfolgerung wäre erst dann statthaft, wenn es gelänge, eine direkte Umfärbung dieser Granula zu beobachten. Wegen der Kleinheit dieser Körnchen ist es jedoch schwierig festzustellen, ob sie sich bereits mit den oxydierten Stufen der Farbstoffe anfärben. Meine Untersuchungen in dieser Hinsicht schlugen fehl. — Nach den Angaben von DREWS u. NIKLOWITZ soll zwar das Formazan des von ihnen benutzten Stilben-TC nicht lipoidlöslich sein, aber weitere Versuche müssen erst klären, inwieweit bei den Cyanophyceen bestimmte Granulatypen als Fermentzentren in Betracht kommen.

### 6. Das Verhalten der Heterocysten (Het.)

Über die Bedeutung und die Funktion der Heterocysten wissen wir praktisch noch nichts. Zwar bestehen mancherlei Theorien über ihre Funktion, doch sind diese untereinander sehr verschieden.

So vermutete man, daß die Aufgabe der Heterocysten darin besteht, die Durchtrennung des Fadens für die Vermehrung zu erleichtern. Sie wurden lange als rückgebildete, nicht mehr teilungs- bzw. keimungsfähige Zellen angesehen. GETTLER (1921), SPRATT (1911), STEINECKE (1932) und FOGG (1949) haben jedoch ein Auskeimen von Het. beobachten können.

GETTLER stellte phylogenetische Spekulationen über die Natur der Heterocysten an und kam zu der Auffassung, daß sie „rudimentäre Fortpflanzungszellen“ sind, die „im Laufe der phylogenetischen Entwicklung ihre eigentliche Funktion verloren haben“. Nur unter bestimmten Bedingungen kann noch ein Auskeimen erfolgen.

Daß die Het. genau wie die vegetativen Zellen eine feulgenpositive Substanz besitzen, erwähnen unter anderen VON ZASTROW (1953), CASSEL u. HUTCHINSON (1954). Auch FOGG (1951) hat mit verschiedenen Kernfärbemethoden eine positive Färbung in den Het. von *Anabaena cylindrica* erhalten.

FOGG (1944, 1949, 1951) hat umfangreiche Untersuchungen über die Entstehung der Het. aus vegetativen Zellen durchgeführt und festgestellt, daß sich die Het. von

*Anabaena cylindrica* dann bilden, wenn der Gehalt des Nährmediums an stickstoffhaltigen Substanzen unterhalb einer bestimmten Grenze liegt. Auf Grund dieser Beobachtungen in Verbindung mit cytologischen Untersuchungen wird angenommen, daß bei Stickstoffmangel einige Zellen eines Fadens zur Rettung der übrigen aufgegeben und ausgezehrt werden. Die aufgebrauchten Zellen stellen dann die Het. dar. Fertig ausgebildete Het. hätten demnach keine Funktion mehr.

Im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen sind die Beobachtungen von CANABAEUS (1929) bemerkenswert. Sie stellte fest, daß die Größe und die Anzahl der Het. einer Kultur in engem Zusammenhang mit dem Nährmedium stehen. Da sich die Het. bei Zusatz von verschiedenen Alkali- und Erdalkalihalogenen vergrößerten und bei Zufügung von Fe-, Co- und Ni-Salzen zum Nährsubstrat verkleinerten, wurden sie von ihr als „Enzymspeicher“ gedeutet.

Bei der Behandlung der Cyanophyceen mit Redox-Indicatoren haben wir gewisse Unterschiede zwischen vegetativen Zellen und Het. festgestellt (DRAWERT u. TISCHER 1956). Im folgenden soll über die Ergebnisse eingehender berichtet werden.

a) *Das unterschiedliche Verhalten von vegetativen Zellen und Heterocysten gegenüber TTC und verschiedenen Redox-Farbstoffen*

Es wurde festgestellt, daß die Reduktion von TTC in den Het. bedeutend früher erfolgte als in den veget. Z. Bereits nach 5 min waren bei *Anabaena variabilis* und *Cylindrospermum licheniforme* in den Het. rot gefärbte Granula vorhanden, während in den veget. Z. erst nach 30 oder 35 min eine Granulafärbung sichtbar wurde. Bereits nach 7 min traten in den Het. neben den gefärbten Granula große rote Formazankristalle auf. Auch bei anderen Arten ergaben sich ähnliche zeitliche Differenzen, so daß ganz allgemein in den Het. das Formazan 20—35 min früher zu erkennen war als in den vegetativen Zellen.

Zunächst lag die Vermutung nahe, daß angesichts des unterschiedlichen Baues von vegetativen Zellen und Het. Permeabilitätsunterschiede die Ursache für diese Erscheinung seien. Es ergab sich jedoch bald, daß diese Annahme nicht zutraf.

So wurde festgestellt, daß auch in vegetativen Zellen zahlreiche große Formazankristalle binnen kurzer Zeit auftraten, wenn das zu untersuchende Präparat dem Licht ausgesetzt wurde. Daraus konnte geschlossen werden, daß das TTC in die vegetativen Zellen ebenso schnell eindringt, wie in die Heterocysten, denn es ist wohl kaum anzunehmen, daß das Licht in so kurzer Zeit die Permeabilität der vegetativen Zellen grundlegend ändert.

Mit Neutralrot (in Phosphatpuffer mit  $p_H$  6,6—6,8) färbten sich die vegetativen Zellen früher als die Het., was auch darauf hindeutet, daß die Het. nicht permeabler sind als die vegetativen Zellen. Daß Neutralrot durch die Het. reduziert werden könnte, war in Anbetracht des hohen Redoxpotentials dieses Farbstoffes nicht anzunehmen. Allerdings kann man nicht ohne weiteres das Verhalten der Zellen gegenüber TTC mit dem gegenüber Neutralrot vergleichen, solange wir über die Art und Weise

der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle nicht genau unterrichtet sind. Während TTC in der Lösung wohl vorwiegend in Form von Ionen vorliegt, dürfte eine Neutralrotlösung bei  $p_H$  6,6—6,8 bereits viele Farbbasemoleküle enthalten (DRAWERT, 1940). Methylenblau eignete sich besser für Vergleichsuntersuchungen. Dieser Farbstoff, der bei  $p_H \approx 7$  (Leitungswasser) noch weitgehend dissoziiert ist, wird nur sehr langsam von den Het. aufgenommen. Bei einer Färbezeit, in der die vegetativen Zellen deutlich gefärbt waren, gelang es nie, eine Anfärbung der lebenden, intakten Het. mit Methylenblau zu erzielen. Dies schien nicht auf eine Reduktion des Farbstoffes in den Het. zurückzuführen zu sein, da der Farbstoff sich auch nicht nach Zugabe von  $H_2O_2$  zum Präparat oder mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen in den Het. nachweisen ließ. Läge eine Reduktion des Farbstoffes vor, hätten die Het. sich mit  $H_2O_2$  blau färben, bzw. hätten sie die Fluoreszenz des reduzierten Methylenblaus zeigen müssen.

Das verschiedene Verhalten von Neutralrot und Methylenblau dürfte aber auch kaum auf die unterschiedliche Dissoziation dieser beiden Farbstoffe und damit auf Permeabilitätsunterschiede zurückzuführen sein; denn selbst bei  $p_H$  8,8 und 10,7 färbten sich die Het. mit Methylenblau schwerer als mit Neutralrot bei  $p_H$  6,8. Es wurden deshalb mit verschiedenen Redox-Farbstoffen Färbungen vorgenommen.

Tabelle 5. *Färbung der Heterocysten mit verschiedenen Redox-Farbstoffen*  
(Die Angaben beziehen sich nur auf die Het. von Fäden, deren vegetative Zellen gefärbt waren)

Farbstoff	$E_0$ -Wert in Volt bei $p_H$ 6,7	$\approx$ %-Satz der gefärbten Heterocysten
Thionin . . . . .	+ 0,06	—
Brillant-Kresylblau . . . . .	+ 0,04	—
Methylenblau . . . . .	+ 0,01	—
Nilblau A . . . . .	— 0,12	30
Janusgrün B . . . . .	— 0,22	30—40
Amethystviolett . . . . .	— 0,25	60
Methylenviolett . . . . .	— 0,26	60
Neutralrot . . . . .	— 0,34	80

Die dabei erzielten Ergebnisse bestätigten die Vermutung, daß dem Redoxpotential der Farbstoffe hier doch eine Bedeutung zukommen muß. Es stellte sich heraus, daß schwer reduzierbare Farbstoffe die Het. schneller anfärbten als leicht reduzierbare (Tab. 5). Bei den vegetativen Zellen konnten derartige Unterschiede nicht beobachtet werden. Berücksichtigen wir ferner noch das „anscheinende Reduktionspotential“ (JERCHEL u. MÖHLE, 1944) vom 2,3,5-TTC mit  $E_0 = -0,083$  Volt bei  $p_H$  6,7, so kann der Unterschied zwischen Het. und vegetativen Zellen nur auf das stärkere Reduktionsvermögen der Het. zurückgeführt werden. Ungeklärt bleibt allerdings die Tatsache, daß sich die reduzierte

Stufe der ersten 3 der in Tab. 5 aufgeführten Farbstoffe weder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> noch fluoreszenzmikroskopisch (Methylenblau) in den Het. nachweisen läßt.

Es kann sich bei den Het. also nicht nur um morphologisch von den vegetativen Zellen abweichend gestaltete Zellen handeln, sondern auch in physiologischer Hinsicht müssen bedeutende Unterschiede vorliegen.

b) *Unterschiede zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten bei der Nadireaktion*

Von besonderem Interesse ist aber noch die Tatsache, daß auch die Granulafärbung mit Indophenolblau in den Het. früher auftrat als in den vegetativen Zellen. Die durchschnittliche Differenz betrug wiederum 30 min.

c) *Oxydation von p-Phenylendiamin*

Aus der Reihe der von PRÁT (1945) benutzten Verbindungen wurde p-Phenylendiamin, das bei Gegenwart von Sauerstoff und vermutlich „Phenylaminasen“ (PRÁT 1945) in eine chinoide Verbindung übergeht, für die Untersuchungen herangezogen. Das von PRÁT ebenfalls benutzte Pyrogallol erwies sich als ungeeignet, weil sich die Lösung bereits nach kurzem Aufenthalt an der Luft stark braun verfärbte. Die p-Phenylendiamin-Lösung behielt dagegen lange Zeit nur einen rosa Schimmer.

Die Cyanophyceen wurden in das Reagens (0,5% ig in Leitungswasser) gebracht, im Dunkeln gehalten und nach einiger Zeit in einem Tropfen Leitungswasser im Mikroskop untersucht.

Die Oxydation von p-Phenylendiamin erforderte allgemein eine längere Reaktionszeit. Die Het. bewiesen aber auch hier ihre besonderen Fähigkeiten. Während die vegetativen Zellen mit Ausnahme der Het.-freien

Tabelle 6. *Oxydation von p-Phenylendiamin, Nadireaktion und Reduktion von TTC in vegetativen Zellen und in Heterocysten einiger Cyanophyceen* (Reaktionszeiten in Minuten, die Prozentzahl neben der Zeitangabe stellt die ungefähre Anzahl der Het. eines Präparates dar, die eine Granulafärbung zeigten)

Art	p-Phenylendiamin		Nadi		TTC	
	veget.Z.	Het.	veget.Z.	Het.	veget. Z.	Het.
<i>Anabaena variabilis</i> . . . . .	—	30 (10%)	35	10	30	5
<i>Anabaena spec. 3</i> . . . . .	—	25 (10%)	40	15	25	5
<i>Anabaena spec. 5</i> . . . . .	—	—	40	20	35	5
<i>Nostoc Kihlmani</i> , Hormogonien	—	—	—	—	40	10
<i>Nostoc spec. 0</i> . . . . .	—	—	—	—	30	5
<i>Nostoc spec. A<sub>4</sub></i> . . . . .	—	40 (10%)	40	10	30	5
<i>Cylindrospermum stagnale</i> . . . . .	—	90 (5%)	50	10	25	5
<i>Cylindrosp. licheniforme</i> . . . . .	—	30 (5%)	30	10	25	5
<i>Tolypothrix spec. X</i> . . . . .	—	90 (10%)	60	10	35	10
<i>Tolypothrix spec. Y</i> . . . . .	—	—	40	—	40	15
<i>Oscillatoria spec. 2</i> . . . . .	90	—	60	—	15	—
<i>Oscillatoria spec. 3</i> . . . . .	30	—	20	—	—	—

Oscillatorien meist nicht in der Lage waren, das p-Phenylendiamin zu oxydieren, konnte in einem Teil der Heterocysten eine dunkelbraune Granulafärbung beobachtet werden (Tab. 6). Es handelte sich um die gleichen Granula, die sich auch mit Formazan und Indophenolblau anfärbten.

*d) Auftreten der Granulafluoreszenz nach Färbung mit Nilblau A und Janusgrün B in vegetativen Zellen und Heterocysten*

Auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach Färbung mit Nilblau und Janusgrün zeichneten sich die Het. dadurch aus, daß zuerst und manchmal nur in diesen die bereits beschriebene Granulafluoreszenz zu erkennen war. Die Unterschiede betragen hier bis zu 55 min. Entsprechend der Giftigkeit dieser Farbstoffe (siehe S. 415) waren die erzielten Ergebnisse aber recht uneinheitlich.

*e) Vergleich zwischen Stärke des Redox-Vermögens und Alter der Heterocysten*

Da nach der Theorie von FOGG (1951) die Entstehung der Het. auf eine Mobilisierung lebensnotwendiger Baustoffe in einzelnen vegetativen Zellen zurückzuführen ist, war es von Interesse, das Redox-Vermögen von Het. verschiedenen Alters und Entwicklungsgrades zu prüfen. Die hohe stoffwechselphysiologische Aktivität der Het., die sich in der Fähigkeit, rasch mit Redoxindikatoren in Reaktion zu treten, äußert, würde für die vorgenannte Theorie sprechen, wenn junge, noch nicht vollständig ausgebildete Het. die stärksten Redoxleistungen vollbrächten und mit zunehmender Ausdifferenzierung eine Abnahme des Redox-Vermögens einträte.

Wie die daraufhin durchgeführten Untersuchungen ergaben, ist jedoch das Gegenteil der Fall. In Entstehung begriffene Het. verhielten sich wie die vegetativen Zellen. Mitunter blieb die Granulafärbung in solchen jungen Het. auch vollständig aus. Die Stärke des Redox-Vermögens wuchs mit dem Grade der Ausdifferenzierung und war am größten in vollständig entwickelten Het. Nach einer gewissen Zeit sterben allerdings die Het. ab. Sie bleiben noch im Verbands des Fadens, zeigen aber keine Redox-Reaktionen mehr. Im allgemeinen wird dann eine benachbarte vegetative Zelle in eine neue Het. umgewandelt.

*f) Diskussion*

*Übereinstimmend hat sich aus allen Versuchen ergeben, daß die Het. in der Lage sind, mit Redox-Indikatoren schneller in Reaktion zu treten als die vegetativen Zellen.* Eine bessere Permeabilität der Het. kann dafür kaum verantwortlich sein. Allem Anschein nach besitzen die Het. eine höhere Stoffwechselaktivität als die vegetativen Zellen (DRAWERT u. TISCHER,

1956). Nach meinen Beobachtungen wird stets die erste Zelle eines jungen, noch von der Dauerzellenwand umgebenen Fadens von *Anabaena variabilis* eine Het. Wenig ältere Fäden sind dagegen meist heterocystenfrei. Erst später wandeln sich wieder vegetative Zellen in Het. um. In diesem Zusammenhang muß auch an die Hormogonien von *Nostoc*-Arten erinnert werden, die an beiden Enden eine kleine und in einem reiferen Stadium noch eine dritte, größere, fast genau in der Mitte gelegene Het. besitzen. Het. kommen also bereits in den frühesten Jugendstadien eines Cyanophyceenfadens vor.

Die Het. besitzen zwar noch die wesentlichsten Bestandteile, welche die vegetativen Zellen auszeichnen; metachromatische Körperchen fehlen aber in der Regel. Nur selten kommen solche vor. Sie sind höchstens in sehr jungen Het. anzutreffen. Da die metachromatischen Körperchen als Reservestoffe aufzufassen sind, ist ihr Fehlen in den Het. verständlich. Die Het. haben noch die Fähigkeit, auszukeimen, wie GERTLER u. a. beschrieben haben; sie tun es aber in der Regel nicht. Nach einem gewissen Zeitraum sind ihre Fähigkeiten erschöpft, und sie sterben ab. Eine ihnen benachbarte vegetative Zelle wird dann meist zu einer neuen Het. — Von zwei nebeneinander gelegenen Het. gab meist nur eine die beschriebenen Redox-Reaktionen. An *Nostoc*-Hormogonien trat dann, wenn die mittlere Het. gebildet war, in den kleinen Endheterocysten keine Granulafärbung mehr auf, sondern diese war beschränkt auf die neue Het. in der Mitte. — Bei Arten mit terminalen Het. bilden oft alte funktionslose Het. die Spitze des Fadens. Treten die Het. intercalär auf, kommt es bei ihrem Absterben häufig zu einem Zerreißen des Fadens.

Bekannt ist ferner, daß sich an Heterocysten häufig Bakterien ansiedeln. Die Het. einiger *Cylindrospermum*-Arten erhalten ja durch sie ihr charakteristisches Aussehen. Offenbar finden die Bakterien an den Heterocysten besonders gute Lebensbedingungen vor.

Die Annahme, daß die Het. lediglich deshalb vorhanden sind, damit die Durchtrennung eines Fadens zum Zwecke der Vermehrung erleichtert wird, muß bereits durch das Vorkommen von nur terminalen Het., z. B. bei *Cylindrospermum*- und *Gloetrichia*-Arten, als widerlegt gelten. Die Durchtrennung oder Scheinverzweigung eines Fadens findet allerdings häufig an einer Het. statt.

Nach der Theorie von FOGG (1951) müssen fertig ausgebildete Het. als funktionslos angesehen werden, denn sie werden ja als das Endprodukt eines Abbauprozesses, der in einzelnen vegetativen Zellen bei Stickstoffmangel einsetzt, gedeutet. In einer in Entstehung begriffenen Het. würden also rasche Ab- und Umbauprozesse ablaufen. Die eigenen Ergebnisse der Versuche mit Redox-Indicatoren weisen auch auf rasche Umsetzungsprozesse in den Het. hin; während aber nach der Theorie von FOGG doch zu fordern wäre, daß junge, noch nicht vollständig ausgebildete Het. die

größten Redox-Leistungen vollbringen, bewiesen die eigenen Ergebnisse das Gegenteil. Das Redox-Vermögen der Het. wächst mit dem Grade ihrer Ausdifferenzierung. In einer vollentwickelten Het. läuft die Reduktion bzw. Oxydation gebotener Indicatoren am schnellsten ab. Wenn die Het. allerdings dann allmählich auch absterben, kann ich doch in dieser Erscheinung keine Bestätigung der Auslegung von FOGG sehen.

Daß eine Beziehung zwischen Heterocystenbildung und Zusammensetzung des Nährsubstrates besteht, hat auch CANABAEUS (1929) festgestellt. Eigene, bei der Kultur der Cyanophyceen gemachte Erfahrungen ließen derartige Zusammenhänge ebenfalls erkennen. Es fanden sich jedoch keine so strenge Gesetzmäßigkeiten, wie sie FOGG (1949, 1951) und CANABAEUS (1929) beobachtet haben.

GEITLERS (1921, 1932) phylogenetische Deutung der Het. kann durch die eigenen Untersuchungen weder bestätigt noch widerlegt werden. Der Autor erwähnt selbst, daß es sich um eine reine Spekulation handelt. Das mitunter beobachtete Auskeimen der Het. kann nicht als Beweis für die Annahme gelten, daß es sich bei den Het. um Relikte früherer Fortpflanzungszellen handelt, die im Laufe der phylogenetischen Entwicklung eine Umbildung erfahren haben. Daß die Het. noch auskeimen können, ist auf Grund des Vorhandenseins kernähnlicher Strukturen im Plasma ohne weiteres erklärlich. Als Dauerzellen können die Het. keinesfalls betrachtet werden. Het. haben nur eine sehr begrenzte Lebensdauer.

Es bleibt noch die von CANABAEUS (1929) vertretene Auffassung über die Funktion der Het. zu erwähnen. Die Autorin deutete die Het. als „Enzymspeicher“, weil sie bei Kulturversuchen feststellte, daß die Het. bei Anwesenheit von Alkali- und Erdalkalihalogenuiden sehr klein waren und sich vergrößerten, wenn Fe-, Co- oder Ni-Salze dem Nährsubstrat zugesetzt wurden. Die Bezeichnung „Enzymspeicher“ muß abgelehnt werden. Der Grundgedanke aber, der zu dieser Auffassung geführt hat, wird durch die eigenen Beobachtungen bestätigt. Auch ich komme zu der Schlußfolgerung, daß die Het. eine Funktion im Rahmen des Stoffwechselgeschehens eines Fadens ausüben. Die Het. sind umgestaltete vegetative Zellen, deren Hauptaufgabe in der Bereitstellung bestimmter Stoffe für die übrigen Zellen besteht. Sie besitzen in besonders reichem Maße physiologisch aktive Stoffe, weshalb sie in der Lage sind, mit gebotenen Redox-Indicatoren rasch in Reaktion zu treten. Die Frage, was den vegetativen Zellen geliefert wird, kann vorerst nicht beantwortet werden. Nach einer bestimmten Zeit sterben die alten Het. ab und neue haben ihre Aufgaben übernommen. Ob von den Het. gebildete Stoffe von Zelle zu Zelle weitergegeben oder durch Ausscheidung nach außen den vegetativen Zellen dienlich werden, muß eine Frage für spätere Unter-

suchungen bleiben. Die Ansiedlung von Bakterien auf bestimmten Hetspricht allerdings dafür, daß gewisse Stoffe nach außen abgeschieden werden.

### III. Zusammenfassung

Es wird auf Grund der Untersuchung von 18 verschiedenen Cyanophyceenarten aus der Reihe der *Hormogonales* bestätigt, daß die Cyanophyceenzelle eine feulgenpositive Substanz im zentralen Bereich des Plasmas besitzt und metachromatische Körperchen, die von dieser unabhängig sind. Die feulgenpositiven Strukturen, die in ihrer Gesamtheit als Chromidialapparat bezeichnet werden, haben Kernfunktion.

Die Methylgrünfärbung ist zum Nachweis von DNS bei Cyanophyceen ungeeignet.

Die metachromatischen Körperchen bestehen in der Hauptsache aus Phosphat. Sie enthalten keine DNS, keine Lipotide und keine Kohlenhydrate (Glykogen). Es konnten in ihnen auch keine Eiweiße nachgewiesen werden.

Kulturversuche haben bestätigt, daß die Anwesenheit von metachromatischen Körperchen vom Lebenszustand der Zellen und vom Phosphatgehalt des Nährmediums abhängig ist. Die metachromatischen Körperchen der Cyanophyceen stellen vermutlich Phosphatreserven dar.

Eine nach Färbung mit basischen Farbstoffen zu beobachtende „Zweischichtigkeit“ der metachromatischen Körperchen beruht auf einer Farbstoffanreicherung an ihrer Oberfläche.

Versuche mit Redox-Indicatoren ergaben, daß die Cyanophyceenzelle außer metachromatischen Körperchen, feulgenpositiven Strukturen und Cyanophycinkörnchen noch zwei weitere Arten von Granula enthält: 1. Über die gesamte Zelle verteilte und an den Zellwänden gehäuft auftretende größere Granula, die sich mit Formazan und Indophenolblau färben; 2. wesentlich kleinere, nur im zentralen Bereich des Plasmas vorhandene, mit reduziertem Nilblau und reduziertem Janusgrün fluorochromierbare Granula.

Für das Zustandekommen dieser Färbungen ist der jeweilige physiologische Zustand der Zellen von großer Bedeutung.

Über den Ort, an dem die Reduktion bzw. Oxydation der gebotenen Indicatoren in der Zelle erfolgt, kann keine Aussage gemacht werden.

Es wurde festgestellt, daß sämtliche Redox-Reaktionen in den Heterocysten schneller ablaufen als in den vegetativen Zellen. Die Heterocysten besitzen demnach eine höhere Stoffwechselaktivität als die vegetativen Zellen. Es wird vermutet, daß die Heterocysten im fertig ausgebildeten Zustande eine bestimmte Funktion im Rahmen des Stoffwechsels eines Fadens ausüben.

Herrn Prof. Dr. H. DRAWERT danke ich für die Anregung der Arbeit.

## IV. Literatur

BIELIG, H.-J., G. A. KAUSCHE u. H. HAARDICK: Über den Nachweis von Reduktionsarten in Bakterien. *Z. Naturforsch.* 4, 80 (1949). — BISWAS, B. B.: Investigation of ribo- and desoxyribonucleic acids in Cyanophyceae. *Current Sci.* 22, 346 (1953). — Chemical nature of nucleic acids in Cyanophyceae. *Nature (Lond.)* 177, 95 (1956). — BRACHET, J.: La détection histochemique des acides pentosenucléiques. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* 133, 88 (1940). — La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibies en voie de développement. *Arch. de Biol.* 53, 214 (1942). — BRINGMANN, G.: Elektronenmikroskopische Studien über die Kernäquivalente und die Zellorganisation von *Bacillus polymyxa*. Prazmowski und anderen Bacillen. *Zbl. Bakter. I* 156, 547 (1951). — Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oscillatorien. *Planta (Berl.)* 38, 541 (1950). — Die Organisation der Kernäquivalente der Spaltpflanzen unter Berücksichtigung elektronenoptischer Befunde. *Zbl. Bakter. II* 107, 40 (1952a). — Über die Beziehung der Kernäquivalente von Schizophyten zu den Mitochondrien höher organisierter Zellen. *Planta (Berl.)* 40, 398 (1952b).

CANABAEUS, L.: Über die Heterocysten und Gasvacuolen der Blaualgen und ihre Beziehung zueinander. *Pflanzenforsch.*, H. 13. Jena 1929. — CASSEL, W. A., and W. G. HUTCHINSON: Nuclear studies on the smaller Myxophyceae. *Exper. Cell. Res.* 6, 134 (1954). — CHOLNOKY, B. J. v.: Zur Kenntnis der Cyanophyceenzelle. *Protoplasma (Berl.)* 28, 524 (1937).

DAVIS, J. C., L. C. WINTERSCHIED, P. E. HARTMANN and S. MUDD: A cytological investigation of mitochondria of 3 strains of *S. typhosa*. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 123 (1953). — DE LAMATER, E. D., and M. E. HUNTER: Preliminary report of true mitosis in the vegetative cell of *Bacillus megatherium*. *Amer. J. Bot.* 38, 659 (1951). — DELAPORTE, B.: Recherches cytologiques sur les Bactéries et les Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* 51/52 (1939/40). — DIETRICH, A.: Naphtholblausynthese und Lipoidfärbung. *Zbl. Path.* 19, 3 (1908). — DRAWERT, H.: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora (Jena)* 134, 159 (1940). — Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. *Planta (Berl.)* 87, 161 (1949). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 263 (1952). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 134 (1953). — Vitalfärbung der Plastiden von *Allium cepa* mit Coelestinblau. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 33 (1954). — DRAWERT, H., u. H. GUTZ: Zur vitalen Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblau. *Naturwissenschaften* 40, 512 (1953). — DRAWERT, H., u. I. METZNER: Vitalfuorochromierung mit Brillantkresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 68, 385 (1955). — Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Cylindrospermum* und einigen anderen Cyanophyceen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 69, 291 (1956). — DRAWERT, H., u. I. TISCHER: Über Redox-Vorgänge bei Cyanophyceen unter besonderer Berücksichtigung der Heterocysten. *Naturwissenschaften* 43, 132 (1956). — DREWS, G.: Zur Frage der TTC-Reduktion durch Cyanophyceen. *Naturwissenschaften* 42, 646 (1955). — DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Zentroplasma und granuläre Einschlüsse von *Phormidium uncinatum*. *Arch. Mikrobiol.* 24, 147 (1956).

FOGG, G. E.: Growth and heterocyst-production in *Anabaena cylindrica* Lemm. I. *New Phytologist* 43, 164 (1944); II. *Ann. Bot. N. S.* 13, 241 (1949); III. *Ann. Bot. N. S.* 15, 23 (1951).

GETTLER, L.: Versuch einer Lösung des Heterocystenproblems. Sitzgsber. d. Akad. d. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. (1921). — Über die am besten bekannten, ältesten Organismen. *Naturwissenschaften* 14, 231 (1926). — Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Europa, Bd. 14. Leipzig 1932. — GLICK, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry. Interscience Publishers I. N. C. New York 1949. — GUILLIERMOND, A.: Nouvelles observations sur la structure des Cyanophycées. *C. r. Acad. Sci. (Paris)* 180, 951 (1925a). — A propos de la structure des Cyanophycées. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* 93, 1504 (1925b). — Nouvelles recherches sur la structure des Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* 38, 129 (1926). — La structure des Cyanophycées. *C. r. Acad. Sci. (Paris)* 197, 182 (1933). — GUTZ, H.: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. *Planta (Berl.)* 46, 481 (1956).

HAHN, F. E.: Über die Kernäquivalente und Reduktionsorte in Bakterien. *Naturwissenschaften* 39, 527 (1952). — HERBST, F.: Cytologische Untersuchungen an Cyanophyceen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 283 (1953). — Über die Kernäquivalente von *Aphanotheca caldariorum* P. Richt. und *Pseudoanabaena catenata* Lauterb. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 183 (1954).

JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. I. Bd. Dresden u. Leipzig (1946). — JERCHEL, D., u. W. MÖHLE: Die Bestimmung des Reduktionspotentials von Tetrazoliumverbindungen. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 77, 591 (1944).

KRIEG, A.: Nachweis von Kernäquivalenten an Cyanophyceen. *Experientia (Basel)* 10, 204 (1954). — KRÜGER-THIEMER, E., u. A. LEMBKE: Zur Definition der Mycobakteriengranula. *Naturwissenschaften* 41, 146 (1954). — KURNICK, N. B.: Methylgreen-pyronin. *J. Gen. Phys.* 33, 243 (1950). — Histological staining with methyl-green-pyronin. *Stain Technol.* 27, 233 (1952). — Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain. *Stain Technol.* 30, 213 (1955).

LILLIE, R. D.: Simplification of the manufacture of Schiff reagent for use in histochemical procedures. *Stain Technol.* 26, 163 (1951).

NAGEL, L.: Volutin. *Bot. Review* 14, 174 (1948).

PERNER, E. S.: Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in *Allium*-Epidermiszellen. *Biol. Zbl.* 71, 43 (1952). — PIEKARSKY, G.: Cytologische Untersuchungen an Paratyphus- und Colibakterien. *Arch. Mikrobiol.* 8, 428 (1937). — PLOTHO, D. v.: Die chromatische Substanz bei Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* 11, 285 (1940). — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHEWSKY: Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceenzelle. *Arch. Protistenk.* 67, 11 (1929). — POLLISTER, A. W., and C. LEUCHTENBERGER: The nature of the specificity of methylgreen for chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 35, 111 (1949). — PRÁT, S.: Reakce sinic a řas a některými aromatickými isomery. *Věstn. Král. české Spol. Nauk. Tř. mat.-přir.* Sep. 39 (1945). — PRENNER, R., u. J. v. PRITWITZ u. GAFFRON: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakterien. *Naturwissenschaften* 39, 128 (1952).

RIED, W.: Formazan und Tetrazoliumsalze, ihre Synthese und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angew. Chem.* 64, 391 (1952). — ROBINOW, C. F.: A study of the nuclear apparatus of bacteria. *Proc. Roy. Soc. Biol. Lond.* 130, 229 (1942).

SALL, T., and S. MUDD: A cytological study of *Caryophanon latum*. *J. Gen. Microbiol.* 12, 47 (1955). — SPRATT, E. R.: Some observations on the life history of *Anabaena cycadeae*. *Ann. of Bot.* 25, 369 (1911). — STEINECKE, F.: Das Auskeimen alter Heterocysten bei *Calothrix Weberi*. *Bot. Archiv* 34, 153 (1932).

WEIL, A.: Mikroskopischer Nachweis einzelner Zellbestandteile. *Abderhalden, Method. d. allgem. vergl. Physiol. Abt. V. II, 1*, S. 448.

ZASTROW, E. M. v.: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. *Arch. Mikrobiol.* 19, 174 (1953). — ZIEGLER, H.: Über die Bildung und Lokalisation des Formazans in der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 40, 144 (1953). — Über die Reduktion des Tetrazoliumchlorids in der Pflanzenzelle und über den Einfluß des Salzes auf Stoffwechsel und Wachstum. *Z. Naturforsch. Sb*, 662 (1953).

*Nachtrag.* Die nach Abschluß vorliegender Arbeit erschienene Mitteilung von DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. III. Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hormogonales. *Arch. f. Mikrobiol.* 25, 333 (1957) konnte nicht mehr berücksichtigt werden. Eine Stellungnahme soll nach der Auswertung laufender elektronenmikroskopischer Untersuchungen von anderer Seite erfolgen.