

BOTANISCHES MUSEUM  
der k. k. Universität.

J. N<sup>o</sup> 11799

B

C 123/24

# Beiträge

zur

# Morphologie der Sprosspilze.

## Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doctorwürde

vorgelegt der

hohen philosophischen Facultät der Universität Bern

von

SIDDY EISENSCHITZ

aus Wien.



Auf Antrag des Herrn  
Prof. Dr. L. Fischer von der Facultät  
genehmigt und mit dem Imprimatur ver-  
sehen.

Der Decan der phil. Facultät  
Prof. Dr. Woker.

Bern, den 2. Mai 1895.

Wien 1895.

Druck v. Alex. Wilh. Wolf & Co., Wien, IX. Währingerstr. 14.



Beiträge  
zur  
**Morphologie der Sprosspilze.**

---

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der philosophischen Doctorwürde  
vorgelegt der  
hohen philosophischen Facultät der Universität Bern

von  
**SIDDY EISENSCHITZ**

aus Wien.

---



Auf Antrag des Herrn  
Prof. Dr. L. Fischer von der Facultät  
genehmigt und mit dem Imprimatur ver-  
sehen.

Der Decan der phil. Facultät  
Prof. Dr. Woker.

Bern, den 2. Mai 1895.

---

**Wien 1895.**

Druck v. Alex. Willh. Wolf & Co., Wien, IX, Währingerstr. 14.

Vorliegende Arbeit wurde im Sommersemester 1894 und im Wintersemester 1894/95 im Laboratorium des Herrn Prof. Dr. S. L. Schenk, Vorstand des Embryologischen Institutes der k. k. Universität Wien ausgeführt, und sage ich dem Herrn Prof. Schenk für die rege Theilnahme und Unterstützung, die er mir während der Ausführung dieser Untersuchung hat zu Theil werden lassen, meinen besten Dank.

# Einleitung.

---

Die Frage nach der physiologischen Bedeutung des Kerns in der Zelle ist in den letzten Jahren wieder lebhafter besprochen worden. Eine grosse Reihe von Histologen, sowohl Botaniker als Zoologen, nehmen an, dass überhaupt keine kernlosen Zellen existieren; andere Forscher behaupten aber, dass es Organismen gebe, in deren Zellen sich kein Kern vorfinde, und rechnen zu diesen kernlosen Elementarorganismen in erster Linie die Saccharomyceten.

Die Aufgabe der im Folgenden niedergelegten Untersuchungen war es, die Saccharomyceten in Bezug auf das Vorhandensein eines Kerns zu studieren, und in dieser Frage, in welcher fast jeder Autor seine eigene Meinung hat, mit Hilfe des modernen Färbungsverfahrens eine Klärung anzustreben.

Die älteren Forscher nahmen das Vorhandensein von Kernen in den Sprossspitzen an.

„Die Pilzzellen“, sagt Naegeli,<sup>1)</sup> „lassen hin und wieder kernhaltige Gebilde erkennen. Die Gährungspilze im Weinmost und in der Bierhefe zeigen oft regelmässig in jeder Zelle ein der Membran anliegendes kleines Kernchen von weisslichem Schleime.“

Genauer über die Gestalt des Kerns in den Sprossspitzen findet sich bei Schleiden.<sup>2)</sup> „Wenn man die fertigen Hefezellen mit Aether, Alkohol oder Kali behandelt und dann von neuem untersucht, so findet man ganz kugelförmige, zarte Zellen, mit dünner, aber deutlicher Wandung, einem wasserhellen Inhalt,

---

1) Naegeli: Zeitschrift für wissenschaftliche Botanik, Band I, Heft 1, p. 45.

2) Schleiden: Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik. 1849, p. 207.

mit bald mehr, bald weniger ganz feinen Körperchen, welche einzeln oder gruppenweise der inneren Fläche der Zellwand ankleben und fast überall ein grösseres, rundes, flaches Körperchen.“ Von diesem Körperchen glaubte er annehmen zu dürfen, dass es der Zellkern der Hefe sei.

Brücke<sup>1)</sup> wendet sich mit Entschiedenheit gegen die Annahme, dass die Zellen der Sprosspilze Kerne besitzen, und sagt: „Ohne behaupten zu wollen, dass Naegeli nicht wirkliche Kerne vor sich hatte, kann ich doch zwei Dinge mit grosser Sicherheit sagen: 1. dass die von mir untersuchten Gährungspilze in voller Lebensthätigkeit und reichlich mit Sprossen verschiedener Grösse versehen waren, und 2. dass ich mit vollkommeneren Vergrösserungsmitteln versehen bin, als dieselben sind, mit denen der grosse Botaniker im Jahre 1844 ausgerüstet sein konnte. Auch durch Jodtinctur konnte kein Kern sichtbar gemacht werden und ebensowenig durch Essigsäure. Körner von wechselnder Grösse und Zahl, wie sie mannigfach vorkommen, für Kerne anzusprechen, ist, glaube ich, niemand berechtigt.“

Der Autorität Brücke's folgend, hielt man nun allgemein die Sprosspilzzellen für kernlos und sah darin einen Beweis, dass der Kern nicht als nothwendiges Attribut der Zelle anzusehen sei. Einen Umschwung in dieser Ansicht bahnte erst F. Schmitz<sup>2)</sup> an, der in seiner Arbeit über den Zellkern der Thallophyten mittheilte, dass er bei Saccharomyceten sicher Zellkerne gefunden habe. „Die ovalen Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* enthalten in dem dichten Plasma meist wenige, grössere Vacuolen; ein Zellkern war noch niemals beobachtet worden. Mit Hilfe der Hämatoxylinfärbung aber ist es mir gelungen, in jeder Zelle einen einzelnen kugeligen Zellkern nachzuweisen. Er findet sich etwa in der Mitte der Zelle neben den grossen Vacuolen dem Plasma eingelagert.“

Seit Schmitz hat sich eine Reihe von Forschern mit dieser Frage beschäftigt, ohne sie aber einer endgiltigen Lösung zuzuführen.

In den letzten Jahren sah sich sogar Möller<sup>3)</sup> auf Grund seiner Untersuchungen über den Zellkern der Sprosspilze zu dem Vorschlage veranlasst, das Genus „*Saccharomyces*“ aus der systematischen Botanik zu eliminieren und die Saccharomyceten unter die Ustilagineen einzureihen; er betrat somit

<sup>1)</sup> Brücke: Die Elementarorganismen. Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften. 44. Bd., 1861.

<sup>2)</sup> Schmitz F.: Sitzungsbericht der niederrheinischen Gesellschaft, 1879. Sitzung vom 4. August.

<sup>3)</sup> Möller H.: Centralblatt für Bakteriologie, XII. Band. 1892, p. 537.

den Weg Bail's, der sich im Jahre 1857 gegen die Aufstellung eines besonderen Genus *Saccharomyces* gewendet hatte; doch war das Bestreben Möller's infolge des energischen Widerstandes, welchen ihm Hansen<sup>1)</sup> entgegengesetzte, erfolglos.

Aus den Angaben der Autoren, welche sich mit der Frage nach dem Vorhandensein eines Kerns in den Sprosspilzzellen beschäftigten, ergibt sich, dass sie alle so ziemlich dieselben Gebilde gesehen haben. Die verschiedene Deutung, welche diese Gebilde erfuhren, erklärt sich wohl daraus, dass die Beobachtungen, welche man an den Hefezellen machen kann, mit den Bildern, die wir aus der Untersuchung anderer Zellen kennen, nicht übereinstimmen.

Wie schon oben bemerkt wurde, war Schmitz der erste, der den Zellkern durch die Färbung nachzuweisen suchte, und er vermochte durch seine Präparate Strasburger von dem Vorhandensein eines Zellkernes in den *Saccharomyceten* zu überzeugen. Während Strasburger<sup>2)</sup> noch im Jahre 1880, in seinem Buche über die Zelle das Vorhandensein von Zellkernen bei den *Saccharomyceten* in Abrede stellte, gab er im Jahre 1884 in seinem „Botanischen Practicum“<sup>3)</sup> eine Methode an, um den Zellkern der Hefe nachzuweisen, und bemerkt dabei, dass die Nachweisung „nicht eben leicht“ sei.

Auch Hansen<sup>4)</sup> gibt an, bei älteren Culturen in ungefärbtem Zustande im Wasser einen Kern gesehen zu haben, und er hat später die Identität der von ihm als Kerne angesprochenen Gebilde mit den von Schmitz gefundenen festgestellt.

Diese Angaben werden auch von Zacharias<sup>5)</sup> und von Zalewski<sup>6)</sup> bestätigt; Zalewski beschreibt einen Zellkern von regelmässiger ellipsoidischer Gestalt mit kleinen Kernkörperchen.

Auch Zimmermann<sup>7)</sup> theilt mit, dass er im Innern der Hefezellen, welche er mit Hämatoxylin gefärbt hatte, dunk-

---

1) Emil Chr. Hansen: Centralblatt für Bakteriologie, XIII. Bd., 1893, p. 16.

2) Eduard Strasburger: Ueber die Zellbildung und Zelltheilung. 3. Aufl., Jena 1880, p. 372.

3) Eduard Strasburger: „Botanisches Practicum“, Jena 1884, p. 351.

4) E. Chr. Hansen: Recherches sur la morphologie des ferments alcooliques, VI. Res. d. c. r. d. trav. du laboratoire de Carlsberg. Vol. II. p. 126.

5) E. Zacharias: Beiträge zur Kenntniss des Zellkernes und der Sexualzellen. Botan. Zeitung, 45. Jahrg., 1887, p. 296.

6) E. Zalewski: Ueber die Sporenbildung in den Hefezellen. Verhandlungen und Sitzungsberichte der Krakauer Akademie der Wissenschaft, 1886, Band XII., p. 124.

7) Zimmermann: Die Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. Breslau, 1885, p. 25.

ler tingierte Gebilde gefunden habe. Dem entgegen bestreitet Krasser<sup>1)</sup> die Kernnatur dieser Gebilde. „Da durch Tinction“, sagt er, „ein Kern nicht sichtbar gemacht werden kann, und ferner kein anderer Grund zur Voraussetzung eines Zellkernes nöthigt, so muss man wohl die Hefezelle als kernlos annehmen. Das aber ist gewiss, was Schmitz und Strasburger als Zellkern der Hefezelle deuten, lässt sich in diesem Sinne nicht auffassen.“

In einer späteren Arbeit hat Krasser<sup>2)</sup> bereits zugegeben, dass er in alten Bierhefzellen thatsächlich Gebilde gesehen habe, welche den von Hansen und Möller beschriebenen Zellkernen gleichen, jedoch habe er in Presshefzellen niemals derartige Gebilde wahrgenommen.

Aus den letzten Jahren liegen uns Arbeiten von Raum, Janssens und Möller vor. Raum<sup>3)</sup> stellt sich der Frage, ob die in den Hefezellen auftretenden Gebilde Kerne seien, ziemlich skeptisch gegenüber. Möller<sup>4)</sup> tritt mit Ueberzeugung für das Vorhandensein von Zellkernen in den Hefezellen ein und Janssens<sup>5)</sup> erklärt, dass „er nicht anstehe, unter den Vertheidigern der Existenz eines Kerns seinen Platz einzunehmen“, und er schreibt es der unvollkommenen Kenntniss der Methode zu, wenn man den Kern in der Hefezelle nicht auffindet.

Alfred Jörgensen<sup>6)</sup> sagt in seinem bekannten Handbuch der Gährungsorganismen, dass der Zellkern in der Hefezelle durch eine Färbung mit Osmiumsäure oder mit Pikrinsäure — Hämatoxylin nachgewiesen werden könne. Nach Hansen ist der Zellkern entweder kugel- oder scheibenförmig; er fand in den alten Hautbildungen von Saccharomyceten Zellen, welche ohne alle Präparation deutliche Zellkerne zeigten.

---

1) Fridolin Krasser: Über das angebliche Vorkommen eines Zellkernes in den Hefezellen. Oesterr. Bot. Zeitschrift. 35. Jahrg. 1885, p. 377.

2) Fridolin Krasser: Oesterr. Bot. Zeitschrift. Band 43, 1893, p. 19.

3) Johannes Raum: Zur Morphologie und Biologie der Sprosspilze. Zeitschrift f. Hygiene. 1891. X. Band, p. 1.

4) Möller l. c.

5) F. A. Janssens: Beiträge zu der Frage über den Kern der Hefezelle. Centralblatt für Bakteriologie. XIII. Band, 1893, p. 639.

6) Alfred Jörgensen: Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie. 2. Auflage. Berlin, 1890, p. 123.



## Methoden der Untersuchung.

---

Es sei mir gestattet, von vorneherein zu bemerken, dass ich die von den früheren Autoren angegebenen Färbungsverfahren sämmtlich wiederholt habe, wenn auch nicht immer mit dem gleichen Resultate. Die verschiedenen Bilder, welche ich bei diesen vielfachen Untersuchungen erhielt, brachten mich zu der Ueberzeugung, dass es nothwendig sei, die Sprosspilze lebend zu untersuchen und die hiebei gewonnenen Bilder mit jenen zu vergleichen, welche man nach den in der Literatur angegebenen Methoden erhalten kann.

Es dürfte nicht überflüssig erscheinen, hier in kurzem die Methoden anzuführen, welche ich in Bezug auf die Darstellung eines Kernes in den Sprosspilzen in der Literatur gefunden habe. Schmitz berichtet, dass er seine Zellkerne in der Hefe durch Färbung mit einer Alaunlösung von Hämatoxylin (Hämal) nachgewiesen habe. Späterhin wandten Schmitz und Strasburger eine Pikrinhämateinfärbung an, indem sie mit Pikrinsäure fixierten und mit Hämateinammoniak färbten. Zalewski brachte die Zellen auf einige Stunden in reines Wasser und behandelte dann mit Hämatoxylin und Alaunlösung. Zacharias extrahierte zuerst mit Aetheralkohol, brachte dann die Hefe in Wasser und färbte darauf mit Grenacher'schem Hämatoxylin. Raum vertheilte die Hefe in dünner Schichte auf Objectträgern, trocknete diese an der Luft und zog sie einigemale durch die Flamme, oder er fixierte sie nach dem Lukjanow'schen Verfahren erst mit Sublimat und trocknete darauf, dann wurden sie nach der Ernst'schen Methode mit einer schwach erwärmten Löffler'schen Methylenblaulösung und einer kalten Lösung von Bismarckbraun behandelt. Ferner erhielt Raum gute Färbungen mit Löffler-

schem Methylenblau und nachfolgendem Entfärben mittels salzsaurem Alkohol. Auch Böhmer'sches und Delafield'sches Hämatoxylin gaben ihm nach vorausgegangenem Auswaschen mit Alkohol gute Resultate; schliesslich empfiehlt Raum Eosin oder Rose-Bengal, mit Nachfärbung in Methylenblau, doch erhielt er weder mit Carbofuchsin, noch mit Platner's Kernschwarz, noch mit essigsauerm Methylgrün positive Resultate.

Möller legt auf das Härten einen sehr grossen Werth und bemerkt, dass er seine Resultate nur durch umfangreiche Versuche über die Ausführung der Härtung erzielt habe. Er empfiehlt als Fixierungsmittel das Jod und zwar als Normalflüssigkeit eine einprocentige, mit Jod gesättigte Jodkaliumlösung. Das Fixierungsmittel wurde entweder als Tropfen zu der auf dem Deckglase in der Nährlösung befindlichen Hefe hinzugesetzt und dann letztere auf dem Deckglase ausgestrichen, oder es wurde eine Platinöse des Hefebreies in einen Tropfen der Lösung eingetragen, fest geschüttelt, auf dem Deckglase ausgestrichen und getrocknet. Auf diese Fixierung folgte die Härtung. Die Härtung geschah durch weitere eintägige Wirkung der Jodlösung und nach dem Abspülen in Wasser und verdünntem Alkohol, durch ein- bis zweitägiges Verweilen in absolutem Alkohol. Möller bemerkt, dass die Härtung umso besser werde, je länger der absolute Alkohol einwirke, doch könne wiederholtes Erhitzen des Alkohols zum Kochen die Zeitdauer wesentlich abkürzen und ein eintägiges Liegen in Chloroform mache oft hinterher die Färbung noch bedeutend klarer. Zur Färbung der gehärteten Präparate benützte Möller verschiedene Farblösungen. Bei der Hämateinfärbung nahm er die Vorbehandlung mit Pikrinsäure so intensiv vor, dass auch nach dem Abspülen mit Wasser ein Rest von Säure zurückblieb; dann verwendete er eine derart hergestellte Hämateinlösung, dass er Hämatoxylin in mit einem Tropfen Ammoniak versetztem Wasser kochte und nachher vorsichtig mit zweiprocentiger Essigsäure ansäuerte.

Unter den Anilinfarben fand er das Ziehl'sche Carbofuchsin, das Löffler'sche Methylenblau, ferner Lösungen des Gentianavioletts in Carbol, in Wasser, in Glycerin, in einprocentiger Essigsäure und in einprocentigem Jodkalium für sehr gute Färbungsmittel, entweder bei Benützung sehr dünner Lösungen oder mittels Ueberfärbung und nachfolgender Differenzierung. Als Differenzierungsmethode empfiehlt er die Gramsche Methode, bei der bekanntlich die Farbe durch Jodjodkalium fixiert und dann durch Alkohol differenziert wird.

Eine noch bessere Methode ist nach Möller die halb-stündige Färbung mittels einer dünnen, wässerigen Gentiana-

violettlösung und die darauffolgende Differenzierung in einem zur Hälfte verdünnten Glycerin.

In seiner zweiten Arbeit<sup>1)</sup> gab er einige Verbesserungen seiner Methode an, da dieselbe, soweit es das Härten in absolutem Alkohol betrifft, langwierig und unzuverlässig war. „Der Umstand, dass es sich bei der Härtung um einen Process der Wasserentziehung handelt, veranlasste mich, höhere Wärme zu Hilfe zu nehmen. Zunächst kochte ich Deckgläser mit den fixierten Hefen in Amylalkohol (Siedepunkt 128° C.). Die Resultate waren zwar nicht genügend, ermutigten aber zu weiteren Versuchen, bei denen ich kochendes Glycerin anwendete. Die Erfolge mit dem letzteren waren über Erwarten gut, und sind die meisten Präparate meiner neueren Untersuchungen so gehärtet worden. Anfangs habe ich jedesmal frisches Glycerin genommen, später benutzte ich wiederholt dasselbe, bemerkte aber, dass mit dem Dickwerden des Glycerins bei fortgesetztem Kochen die Wirkung sehr nachliess. Ich verdünnte deshalb wiederholt mit Wasser und machte dadurch das eingedickte Glycerin wieder brauchbar, bis ich durch den Erfolg sehr starker Verdünnung veranlasst wurde, einfach durch 1 bis 2 Minuten fortgesetztes Kochen in reinem Wasser das Gleiche zu erzielen. Ein Vortheil des kochenden, wasserhaltigen Glycerins zum Härten von Deckglaspräparaten bleibt aber die Vermeidung des heftigen Stossens beim Sieden. Für die Färbung bin ich von der Anwendung des Gentianavioletts zurückgekommen, nachdem ich in der Hämatoxylin-Eisenlackfärbung nach M. Heidenhain<sup>2)</sup> in dessen Untersuchung über „Kern und Protoplasma“ eine ebenso intensive, wie leicht zu differenzierende Kernfärbung kennen gelernt hatte, welche ich später ausschliesslich verwendet habe. Ich habe dabei eine drei- bis vierprocentige Lösung des schwefelsauren Eisenoxyd-Ammoniaks benützt, in der die Deckglaspräparate mindestens 2 Stunden belassen wurden, um dann nach kurzem Abspülen in Wasser eine halbe Stunde in eine gesättigte Lösung von Hämatoxylin im Brunnenwasser gebracht zu werden. Die stark überfärbten Präparate werden gut ausgewaschen und unter beständiger Controle unter dem Mikroskope  $\frac{1}{2}$  bis 2 Minuten in derselben obigen Eisenlösung differenziert.“

Aus diesen Literaturangaben erhellt, dass die Autoren sämmtlich die bei bakteriologischen Untersuchungen übliche Herstellung von Deckglastrockenpräparaten verwendeten. Wie meine Untersuchungen zeigten, ist diese Methode, welche auf

---

1) H. Möller. Centralblatt für Bakteriologie, XIV. Band, 1893, p. 358.

2) Festschrift F. Kölliker, 1892, p. 118.

der Fixierung durch Coagulation des Eiweisses und durch Wasserentziehung beruht, für den hier verfolgten Zweck nicht brauchbar, und ich habe aus diesem Grunde ein anderes Verfahren in Verwendung gezogen, welches auf der Aufnahme gewisser Farbstoffe durch die lebenden Zellen beruht.

Meine Untersuchungen bezogen sich auf folgende Arten von Sprosspilzen:

Käufliche Presshefe.

*Saccharomyces apiculatus* (aus Wein gezüchtet).

*Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces glutinis*.

*Saccharomyces pastorianus* (aus Presshefe gezüchtet).

*Saccharomyces Kefir*.

*Mycoderma vini*.

Als das weitaus beste Material für die Untersuchung erwies sich die käufliche Presshefe, sowie der aus ihr gewonnene *Saccharomyces pastorianus* und das *Mycoderma vini*. Als das am wenigsten geeignete Material zeigte sich die Kefirhefe, weil die einzelnen Hefezellen sehr klein sind, und eine Beurtheilung der Tinctionsverhältnisse bedeutend schwerer fällt, als bei den grösseren Zellen der Presshefe.

Untersucht man die Presshefe frisch im Wasser, so findet man bald, dass die Structur bei Anwendung entsprechender Immersionslinsen und enger Blende bedeutend klarer in Erscheinung tritt, als an den Ausstrichpräparaten, die man nach der in der Bakteriologie üblichen Methode getrocknet und fixiert und in Balsam eingeschlossen hat. An den fixierten Präparaten erscheinen die Zellen kleiner, wie geschrumpft, und legen die Annahme nahe, dass diese Veränderungen durch das Fixieren in der Flamme veranlasst seien.

Ich führte meine Untersuchungen in folgender Weise durch:

Die Sprosspilzzellen wurden auf dem Objectträger oder auf einem Uhrglas mit der vollkommen concentrirten Farbstofflösung in Verbindung gebracht, und nachdem die Farbe entsprechend lange auf den Hefebrei eingewirkt hatte, wurde eine kleine Menge des gefärbten Hefebreies mittels der Platinöse auf dem Objectträger vertheilt, mit dem Deckglase bedeckt und der Untersuchung unterworfen. In einer anderen Reihe der Untersuchung wurde die Hefe zuerst der Einwirkung von Reagentien ausgesetzt und dann erst gefärbt. Ich führte diese Versuchsreihe derart aus, dass ich die Hefe in

einer Eprouvette oder in einem kleinen Spitzglase, welche vorher sterilisiert waren, mit den betreffenden Reagens überschüttete, möglichst sorgfältig vertheilt und dann ruhig stehen liess, bis sich die Hefe am Boden abgesetzt hatte. Mittels einer kleinen Pipette wurde etwas von dem am Boden der Eprouvette oder des Spitzgläschens liegenden Hefematerial aufgezogen, wieder in Wasser vertheilt und untersucht. Als Reagentien kamen in Anwendung: Alkohol, Aether, eine Mischung von Alkohol und Aether, Chloroform, verdünnte Salzsäure, Essigsäure, verdünnte Kalilauge, Sodalösung, zehnpcentige Kochsalzlösung, Chromsäure, Lugol'sche Lösung (Jodjodkalium), endlich Müller'sche und Flemming'sche Flüssigkeit.

In einer dritten Reihe von Versuchen wurde in ganz entsprechender Weise die Hefe mit Farbenlösungen von nur mässiger Concentration in Verbindung gebracht, um zu untersuchen, ob nicht während des Absetzens der in den Lösungen fein vertheilten Hefe, eine andere Färbung eintrete, als sie bei der Färbung auf dem Objectträger zu erzielen war.

Dabei erwies sich, dass diese in der dritten Reihe der Versuche angewendete Methode der Einfachfärbungen nicht mehr erzielen lasse, als die Färbung auf dem Objectträger, dass sie aber bei Doppeltfärbungen vortheilhaft sei.

Ich will hier noch ausdrücklich bemerken, dass nach meinen Untersuchungen dem Härten der Hefe ein geringer Werth beizulegen ist, und ich glaube hierin den Angaben von H. Möller entgegenreten zu dürfen, der dem Härten und Fixieren eine ausserordentliche Bedeutung beimisst. Unter den von mir als Härtingsflüssigkeiten versuchten Reagentien habe ich von der Müller'schen Flüssigkeit die besten Resultate gesehen, insbesondere hat mir jene Hefe, welche sich durch 24 Stunden in Müller'scher Flüssigkeit befunden hatte, bei der Doppeltfärbung mit Methylgrün und Säurefuchsin ausgezeichnet schöne Bilder gegeben.

Von Färbungen habe ich eine sehr grosse Anzahl versucht. Die in der Bakteriologie zur Verwendung kommenden Anilinfarbstoffe wurden fast sämmtlich geprüft; ebenso die Farbstoffe, welche bei der von Professor Ehrlich eingeführten farbenanalytischen Untersuchung des Blutes gebraucht werden. Auch eine Anzahl von Farbstoffen, welche als Kernfarbstoffe bekannt sind, wurde theilweise für sich, theilweise in Verbindung mit anderen Farben benützt. Die schönsten Resultate erzielte ich mit Methylgrün und mit Benzopurpurin, weiterhin mit einer Mischung von Methylgrün und Säurefuchsin, mit Congoroth und mit ammoniakalischem Carmin; weniger schöne, aber noch

immer sehr instructive Bilder gab eine wässerige Lösung von Cyanin mit Nachbehandlung in fünfzigprocentiger Kalilauge und weiterhin Jodkalium in Verbindung mit concentrirter Schwefelsäure, sowie Grenacher's Hämatoxylin mit Nachbehandlung in Alaunlösung. Mit Methylenblau und mit Eosin, sowie mit Gentianaviolett und mit Carbofuchsin, habe ich keine befriedigenden Resultate erhalten.

Bezüglich der Färbung mit Congoroth möchte ich noch hinzufügen, dass dessen Eigenschaft, schon bei dem Vorhandensein einer geringen Menge von Salzsäure einen blauen Niederschlag zu geben, auch bei den hier in Rede stehenden Färbungen verwendet werden kann; bei sehr vorsichtiger Anwendung von verdünnter Salzsäure gelingt es, eine Blaufärbung der kurz vorher roth gefärbten Körnchen zu erzielen.

Der Umstand, dass ich bei meinen Untersuchungen fast immer den Raum zwischen Deckglas und Objectträger mit Wasser ausfüllte, ermöglichte es, das Zufließen von Reagentien unter dem Mikroskope deutlich zu beobachten. Auch versuchte ich das Zustandekommen der mikrochemischen Reaction dadurch zu beschleunigen, dass ich das Deckglas von dem Objectträger vorsichtig abhob, auf das unmittelbar vorher untersuchte Material das neue Reagens brachte und mit dem alten Deckglas bedeckte.

Zum Studium der Detailverhältnisse ist es jedenfalls nöthig, die Präparate in einer wässerigen Flüssigkeit anzusehen. Glycerin lässt sich leider nicht verwenden, weil es bei der Tinction mit Anilinfarbstoffen in einer ganz energischen Weise entfärbend wirkt.

Von dem Gebrauche der sonst üblichen Einschlussmittel Canadabalsam, Dammarlack, Cedernöl und Farrant'sche Lösung möchte ich abrathen. Damit stimmt eine Bemerkung Möller's<sup>1)</sup> überein, dass beim Einschliessen in Canadabalsam und Dammarlack nicht nur Schrumpfungen der ganzen Zellen, sondern auch einiger Inhaltsbestandtheile in besonderem Masse stattfinden.

Die Untersuchung der Hefezellen ohne weitere Präparation in reinem Wasser, lässt kaum mehr erkennen, als Zellen von mehr oder weniger elliptischer Gestalt und mit grösseren oder kleineren Gebilden von eigenthümlich matten Glanze im Inneren.

Wenn man auf die Zellen reine Salzsäure bringt, so sieht man dann in den Zellen neben ein bis zwei grösseren mattglänzenden Gebilden zahlreiche Körnchen.

<sup>1)</sup> Möller: Centralblatt für Bakteriologie, XII. Band, p. 544.

Wenn man aber auf die Hefezellen durch kurze Zeit eine verdünnte  $\frac{1}{2}$  %ige Aetzkalklösung einwirken lässt, so verschwinden die Körnchen.

In ähnlicher Weise wirkt die Peptonisierung auf die Hefezellen ein. Wenn man lebende Hefezellen in eine Pepsin und Salzsäure enthaltende künstliche Verdauungsflüssigkeit auf einige Stunden einträgt, so erscheinen die Zellen wie gequollen, es lässt sich nichts mehr deutlich erkennen, nur hin und wieder treten in dem Plasma der Zellen Körnchen auf.

Jodjodkalium, auf die Zellen gebracht, gibt ihnen eine gelbbraune Farbe, welche die Formationen im Innern der Hefezellen nicht hervortreten lässt; fügt man aber Schwefelsäure hinzu, so treten die Körnchen sehr deutlich hervor. Auch nach Behandlung mit reiner Essigsäure zeigen die Zellen zahlreiche glänzende Körnchen. Auch mit Sodalösung oder mit 10%iger Kochsalzlösung behandelte Hefezellen lassen eine Körnelung erkennen.

An allen Präparaten, sowohl an den ungefärbt untersuchten, wie auch an jenen Präparaten, welche mit einer der genannten Farben tingiert worden waren, fällt auf, dass das Bild der Zellen sehr variabel ist. Ganz abgesehen von der sehr verschiedenen Gestaltung und Grösse der Zellen ist auch die innere Struktur derselben nicht gleich. An einzelnen Individuen nimmt das mattglänzende Innengebilde, welches von fast allen Autoren als Vacuole angesehen wird, beinahe den ganzen Raum der Zelle ein, an anderen Zellen ist dieses Gebilde auffallend klein, an einer dritten Reihe von Zellen erscheint die Vacuole durch eine Einschnürung in zwei Theile getrennt, und an noch anderen Zellen liegen thatsächlich zwei, in manchen sogar mehrere Vacuolen getrennt nebeneinander. Auch die Art, wie die Körnchen in den einzelnen Zellen erscheinen, ist veränderlich. Bald liegen die Körnchen dicht gedrängt um die Peripherie der Vacuole, bald ist ihre Zahl ziemlich beschränkt. In einzelnen Zellen liegen die Körnchen auch innerhalb der Vacuole oder hart an ihrer Grenze; in einer anderen Reihe von Zellen scheint es, als ob die Körnchen aus dem Plasma austreten wollten, und bei noch anderen liegen einzelne Körnchen thatsächlich ausserhalb des Plasmas. Dieses verschiedene Verhalten der Zellen lässt sich wohl mit ihrer verschiedenen Lebensthätigkeit, insbesondere mit den verschiedenen Stufen der Entwicklungsvorgänge im Zusammenhang bringen. Damit stimmt auch die verschiedene Affinität der Zellen zu den Farbstoffen überein; bei der Tinction der Zellen, sei es nach der oben beschriebenen Me-

thode, sei es nach der Methode der Fixierung in der Flamme, wie sie bei der Färbung auf Bakterien allgemein üblich ist, kann man fast an jedem Präparat die Beobachtung machen, dass trotz sorgsamer Ausführung und trotz sorgfältigen Verstreichens des Materials auf dem Deckglase die einzelnen Zellen in verschiedener Intensität den Farbstoff aufgenommen haben. Während einzelne Zellen stark gefärbt sind, zeigen andere Zellen trotz unmittelbarer Nachbarschaft einen sehr blassen Farbenton. Ebenso ist es mit den Körnchen; nicht an allen Zellen treten sie in gleicher Weise hervor, bei manchen Zellen erscheinen sie sehr dunkel gefärbt und heben sich von dem umgebenden Plasma ausserordentlich scharf ab; an anderen Zellen desselben Präparates zeigen sich aber die Körnchen viel weniger tingiert.

Dieses so verschiedene Verhalten der Hefezellen gegenüber den Farbstoffen dürfte mit ein Grund dafür sein, warum über den inneren Bau der Sprossspilzzellen noch keine Klarheit herrscht. Die Bilder, welche ich an meinen Präparaten gesehen habe, nöthigen mich zu der Annahme, dass die Körnchen kein zufälliger Befund sind, und dass man in ihnen etwas mehr als die Granulirung des Zellprotoplasmas zu sehen hat, und ich werde am Schlusse der Arbeit meine Hypothese über die Bedeutung der Körnchen auseinandersetzen.

Im Grossen und Ganzen ist das Vorkommen von Körnchen im Plasma einzelliger Organismen nichts Seltenes.

Schmitz<sup>1)</sup> fand im Protoplasma der Phycochromaceen kleinere und grössere Körnchen in sehr wechselnder Menge vertheilt, welche durch Färbungsmittel eine dunklere Farbe annahmen und sich gegen Hämatoxylin ganz ähnlich verhielten, wie die Chromatinkörner der Zellkerne. Diese Angaben wurden von Strasburger<sup>2)</sup> bestätigt. Zacharias<sup>3)</sup> beschreibt ebenfalls im Zellplasma von *Tolypothrix aegagropila* glänzende Körnchen, welche besonders dicht um den Zellkern herum angehäuft waren.

In verschiedenen Bakterienarten und manchen anderen kryptogamischen Pflanzen fand P. Ernst<sup>4)</sup> „sporogene Körner“ und erklärte sie für Zellkerne, denen die Fähigkeit zukommt,

<sup>1)</sup> F. Schmitz: Untersuchungen über den Zellkern der Thallophyten. Sitzungsberichte der niederrheinischen Gesellschaft für Natur- und Heilkunde. 1879.

<sup>2)</sup> E. Strasburger: Botan. Practicum. 1884, p. 351.

<sup>3)</sup> E. Zacharias: Beiträge zur Kenntnis des Zellkerns und der Sexualzellen. Botan. Zeitung, 1887, p. 301.

<sup>4)</sup> P. Ernst: Ueber den Bacillus Xerosis und seine Sporenbildung. Zeitschrift für Hygiene 1888, Band IV, p. 25. — Ueber Kern- und Sporenbildung in Bakterien. Ebenda 1889, Band V, p. 248.



selbst zu Sporen zu werden. Neisser<sup>1)</sup> hielt dieselben Einschlüsse für sporenartige Gebilde, wogegen Babes<sup>2)</sup> ihnen wohl bei dem Theilungsprocesse und bei der Sporenbildung eine Rolle zuschrieb, sie aber nicht für Sporen im strengen Sinne des Wortes ansehen wollte.

Löffler und Klebs<sup>3)</sup> fanden bei der Färbung mit Methylenblaulösung und Entfärbung mit Alkohol Körnchen in den Diphtheriebacillen, und Klebs sprach die Vermuthung aus, dass die blau gebliebenen Körner von stark färbbarer Substanz eingehüllte Sporen sind. Auch Steinhauser<sup>4)</sup> schreibt den sporogenen Körnern sowohl bei der Theilung, als auch bei der Sporenbildung eine Rolle zu und meint, dass nicht in allen Fällen die „sporogenen Körner“ morphologisch einander gleichzustellen sind; er schlägt deshalb vor, diese Gebilde mit dem nichts präjudicierenden Namen „Granula“ zu bezeichnen.

Raum<sup>5)</sup> hat in seiner oben angeführten Arbeit diese Granula bei den Hefezellen genau studiert und gibt an, dass sie bei der Färbung mit Methylenblau und Bismarckbraun einen gesättigt schwarzen oder dunkelbraunen Ton annehmen, und dass sie sich bei der Färbung mit Eosin und Methylenblau dunkelviolettfärben. Er hebt hervor, dass sie sich wohl bei allen Hefearten, aber keineswegs in jeder Hefezelle vorfinden, schreibt ihnen eine halbflüssige Consistenz zu, hält sie für membranlos und gibt an, dass sie unter temporärem Verluste ihrer sphärischen Form ihren Platz verlassen können.

Da er in den wohlernährten, Gährung unterhaltenden Zellen vollkommen deutliche Granula, in den schlecht ernährten oder senilen Formen die Granula nur in geringer Zahl oder gar nicht fand, so hält er die Granula für ein Merkmal von Zellen, welche sich in sehr günstigen Lebensverhältnissen befinden und auf der Höhe ihrer Lebensthätigkeit stehen.

Er fasst sie als eigenthümlich modificierte Körner des Zellprotoplasmas, also als paraplastische Einschlüsse auf, welche sowohl unter einander confluieren, als auch für sich an

---

1) Neisser: Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptococci und Choleraspirillen. Ebenda 1888, Band IV, p. 166

2) Babes: Ueber isolirt färbbare Antheile von Bakterien. Ebenda 1888. Band V, p. 173.

3) Klebs: Allgemeine Pathologie. 1887, Th. I, p. 194.

4) Steinhauser: Zur Lehre von den sporogenen Körnern. Verhdlngn. der biolog. Sect. der Warschauer Naturforscher-Ges. 1889, Nr. 3, (russ.) Biol. Centralblatt 1889, Band IX, Nr. 17. — Les granules des microbes Associat. Franc. pour l'avancement d. sciences Congres de Paris 1889.

5) F. Raum: Zur Morphologie und Biologie der Sprosspilze. Zeitschrift für Hygiene, X. Band, 1891, p. 20.

Grösse zunehmen können. Er bemerkt ausdrücklich, dass diese Gebilde weder bei der Sprossung noch bei der Sporenbildung ein obligatorisches Zubehör sind. „Die beiden genannten Prozesse können bei der Hefe bald in Gegenwart dieser Granula, bald in Abwesenheit derselben vor sich gehen“.

Neben den Körnchen haben nach meinen Untersuchungen auch die *Vacuolen* eine grosse Bedeutung, und zwar eine andere, als man ihnen gewöhnlich zuzuschreiben pflegt. Eine genaue Beschreibung der *Vacuolen* in den *Saccharomyces*zellen rührt von *Zalewski*<sup>1)</sup> her; er fand in dem feinkörnigen Protoplasma von *Saccharomyces cerevisiae* eine Anzahl kleiner *Vacuolen*, welche zusammenfliessen und sich zu gewisser Zeit in einen Kranz von 7 bis 5 *Vacuolen* gruppieren, die allmählig ihren Inhalt vereinigen, indem zunächst nur 4, dann 3, nachträglich 2 und schliesslich eine einzige aber mächtige, den grössten Theil der Hefezellen einnehmende, mit Flüssigkeit erfüllte *Vacuole* sichtbar wird. Durch diesen Vorgang wird das Protoplasma an die Zellwand verdrängt und bildet die an einer oder mehreren Stellen etwas stärkere, wandständige Protoplasmaschicht. In diesen Verdickungen entwickelt sich bald eine von der *Vacuole* aus vordringende Vertiefung, welche aber niemals die Zellwand erreicht. In jeder der beiden auf diese Weise getrennten, der Furche anliegenden, fast homogenen Protoplasmaportionen sah *Zalewski* je einen dunkleren, „undeutlich construierten“ Punkt, den er als Kernkörperchen ansprach. Nach den Untersuchungen, die *F. A. F. C. Went*<sup>2)</sup> über die *Vacuolen* der Pflanzenzellen ausführte, finden sich die *Vacuolen* in allen lebenden Zellen der Pflanze, und die Vermehrung derselben erfolgt durch Theilung. Den Wänden der *Vacuole* (*Tenoplasten*) schreibt er als Organen des Protoplasmas denselben Rang zu, wie den Kernen und den *Chromatophoren*. Auch *Hugo de Vries*<sup>3)</sup> erblickte in den *Vacuolen* besondere Zellorgane, welche sich nicht durch Zufall im Zellkörper neu bilden, sondern gesetzmässig durch Theilung entstehen, und deren Wand die Aufgabe hat, die Ausscheidung und Anhäufung der im Zellsaft vorhandenen gelösten Stoffe zu regeln.

---

1) *Zalewski*: Ueber die Sporenbildung in den Hefezellen. Sitzungsberichte der Krakauer Akademie der Wissenschaften. 1886, Band XIII.

2) *F. A. F. C. Went*: Die Vermehrung der normalen *Vacuolen* durch Theilung. *Pringsheim's Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik*. Bd. XIX. Heft 3, p. 295. *F. A. F. C. Went*: De jongste toestanden der *Vacuolen*. Amsterdam 1886.

3) *Hugo de Vries*: Plasmolytische Studien über die Wand der *Vacuolen*. *Pringsh. Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik*. Band 16. 1885.

Andere Arbeiten, wie die von W e r m i n s k i<sup>1)</sup>, schreiben den Vacuolen eine active Bedeutung für das Leben der Zelle zu; so sollen sich in Endospermzellen der reifen Samen von Ricinus aus den darin enthaltenen Vacuolen Aleuronkörner bilden, und umgekehrt, beim Keimen reifer Samen sollen sich die Aleuronkörner wieder in Vacuolen verwandeln.

Was das Vorkommen der Vacuolen in den Saccharomyceszellen betrifft, so meint R a u m<sup>2)</sup>, dass sie kein nothwendiges Attribut jeder einzelnen Zelle seien, und dass es den Anschein habe, als ob gerade die unter ungünstigen Ernährungsbedingungen lebenden Hefezellen ausserordentlich häufig Vacuolen bilden, und als ob ein Antagonismus zwischen den die Entwicklung von Granula begünstigenden Momenten einerseits und den das Entstehen von Vacuolen fördernden Umständen anderseits existiere. Nach R a u m stellen die Vacuolen nichts anderes dar, als specifisch veränderte protoplasmatische Körper, ja, er meint, dass auch sie eine Art paraplastischer Einschlüsse darstellen.

„Könnte man nicht annehmen“, sagt R a u m<sup>3)</sup> „dass die Bildung von Granula und diejenige von Vacuolen sich gewissermassen wie zwei Arten von Umwandlungen der Hefezellen verhalten? Allerdings wird der Ausdruck Umwandlung hier im weitesten Sinne gebraucht, womit keineswegs gesagt werden soll, dass die im Zustande von Umwandlung befindlichen Zellen Individuen mit beeinträchtigter Lebensthätigkeit sind. Wie dem auch sein mag, der allgemeine Sinn des ganzen Vorganges ist der: Indem die indifferenten Körner des Protoplasmas, welche normaler Weise nur Bismarckbraun aufnehmen, unter Aufspeicherung von gewissen Substanzen wachsen oder aufquellen, acquirieren sie die Fähigkeit, sich mit Methylenblau und Bismarckbraun schwarz oder dunkelbraun zu färben; indem sie unter Aufquellen andere Substanzen aufspeichern, oder gewisse Stoffe einbüssen, werden die besagten Körner den genannten Farbstoffen gegenüber refractär. Im ersten Falle bekommen wir statt der indifferenten Protoplasmakörner typische Granula, im zweiten Vacuolen, daraus erhellt, dass wir die Bildung der Granula oder Vacuolen als Ausdruck dieser oder jener Modification der Ernährungsvorgänge in den Hefezellen ansehen müssen.“

---

1) Werminski: Ueber die Natur der Aleuronkörner. Bericht der Deutsch. Bot. Ges. 1888. Bd. VI. Heft 6, p. 199. Compt. rend. de la séance de la section de Biologie de la Société des naturalistes de Varsovie. 10. Oct. 1890.

2) Raum: l. c. p. 24.

3) Raum: l. c. p. 27.

An einer anderen Stelle bemerkt Raum ganz richtig, dass die Entscheidung über derartige Fragen nur durch die Untersuchung lebender Objecte möglich ist. Nun gibt aber die bisherige Untersuchung lebender Zellen bei den gewöhnlich zur Anwendung gebrachten Methoden in Folge der optischen Verhältnisse keinen näheren Aufschluss über das Verhalten der Körnchen und der Vacuolen, und es bedarf eigener Kunstgriffe, um sich ohne Abtödtung der Zellen über die Formationen in deren Inneren zu orientieren.

Aus den Untersuchungen von Cornil und Babes<sup>1)</sup> und von Birch-Hirschfeld<sup>2)</sup> ergibt sich, dass die lebenden Objecte unter gewissen Umständen Farbstoffe anzunehmen vermögen. Von diesen Mittheilungen ausgehend, habe ich in vielfacher Weise Sprosspilze in gefärbten Nährlösungen zu cultivieren versucht. Es wurde als Nährmedium Bierwürze verwendet, welche mit den verschiedensten Farbstoffen versetzt wurde. Am geeignetsten erwies sich der Zusatz einer 1%igen wässerigen Benzopurpurinlösung, da dieser Farbstoff zum Unterschied von den meisten anderen, in Gebrauch gezogenen Tinctionsmitteln keinen Niederschlag bildete; auch Methylgrün und Congoroth gaben gute Resultate. Selbstverständlich müssen die Farblösungen vor ihrer Verwendung sorgfältig sterilisiert sein, am besten ist es, gleich von Anfang an zur Auflösung des Farbstoffes sterilisiertes destillirtes Wasser zu verwenden und mit einer sterilisierten Pipette in die Bierwürze einige Tropfen der Farblösung einfließen zu lassen.

Lässt man in der gefärbten Bierwürze die Saccharomyceszellen sich durch einen Tag oder durch zwei Tage entwickeln, so findet man in den Zellen einzelne gefärbte Körnchen, theilweise in den Vacuolen, theilweise ausserhalb derselben. Die Körnchen innerhalb der Vacuolen zeichnen sich durch eine ganz besondere lebhaftere Eigenbewegung aus; es wird vollkommen deutlich, dass jedes von den innerhalb der Vacuole herum schwärmenden Körnchen einen Hof hat, der hell erscheint, während das Körnchen selbst gefärbt ist; die Körnchen drehen sich bei ihren Bewegungen um ihre eigene Achse, und bei manchen Stellungen erscheinen sie ungefärbt, wahrscheinlich dann, wenn gerade eine Stelle des Hofes dem Beschauer zukehrt ist; alsbald aber tritt wieder bei einer Aenderung der Stellung die rothe Farbe des Körnchens auf.

Zahlreiche in dieser Richtung angestellte Untersuchungen haben übereinstimmend ergeben, dass diese Körnchen das erste

<sup>1)</sup> Les Bactéries, II. edition, p. 72.

<sup>2)</sup> Birch-Hirschfeld: Ueber die Züchtung von Typhusbacillen in gefärbten Nährlösungen. Archiv für Hygiene, VII. 1887.

sich färbende Element in den Sprossspilzzellen bilden; durch ihre Tinction heben sie sich sehr auffallend von dem ungefärbten Plasma und von der Vacuole ab.

Ganz eigenthümlich erscheinen die Lageveränderungen der Körnchen innerhalb des Plasmas. Während die innerhalb der Vacuole schwärmenden Körnchen sich ausserordentlich rasch bewegen, ist die Bewegung innerhalb des Plasmas ziemlich langsam und kann nur bei einer entsprechend langen Betrachtung einer einzelnen Zelle deutlich gesehen werden. Man kann manchesmal sogar beobachten, dass die Körnchen aus der Vacuole heraus in das Plasma treten und sich hier weiterbewegen, ja, wieder aus dem Plasma heraustrreten können, um sich an den äusseren Zellrand anzulegen.

Nach dem Verhältnisse der Zahl der sich färbenden Körnchen zu den Vacuolen lassen sich nach meinen Untersuchungen drei Arten unter den Sprossspilzzellen unterscheiden. Die eine Art zeigt Vacuolen und zahlreiche Körnchen, die zweite Art zeigt blos Körnchen und entbehrt der Vacuolen, und die dritte Art zeigt neben den Vacuolen nur sehr wenig Körnchen.

In der ersten Art ist die Grösse der Vacuolen und die Grösse der Körnchen sehr wechselnd. Die Zahl der Vacuolen variiert zwischen eins und drei. Die Grösse der Körnchen in einer Zelle ist sehr ungleich. Zumeist liegen die grösseren Körnchen an der Peripherie der Vacuolen.

In den körnchenarmen Zellen kann man auch an den Vacuolen selbst langsame Bewegungserscheinungen vor sich gehen sehen. Die Vacuolen zeigen Einschnürungen und andere Formveränderungen und scheinen sich zu vergrössern und zu verkleinern.

In der zweiten Art der Hefezellen, in den körnchenreichen Zellen ohne Vacuolen, wechselt das Bild der Granula noch mehr. Oftmals liegen im Innern der Zelle Körnchen so dicht gedrängt nebeneinander oder confluieren miteinander vollständig, so dass sie einen Kern zu bilden scheinen, der sich in seinem tinktoriellen Verhalten von den übrigen Körnchen nicht unterscheidet.

Die dritte Art der Zellen zeichnet sich dadurch aus, dass die Vacuole ausserordentlich gross ist und den ganzen Raum der Zelle einnimmt, so dass das Plasma auf einen ganz schmalen Saum reduciert erscheint, in dem ich mittels der Farbstoffe von Körnchen entweder nur wenige oder keine sichtbar machen konnte.

Diese Beobachtungen nöthigen mich, einen innigen Zusammenhang zwischen den Vacuolen und den Körnchen anzunehmen. Auch Raum hat, wie ich

oben anführte, die Beobachtung gemacht, dass die Vacuolen und die Granula sich als unbeständige Gebilde erweisen, welche unter gewissen Umständen auftauchen, unter anderen aber spurlos verschwinden, und er nimmt auf Grund seiner Beobachtungen einen Antagonismus zwischen den die Entwicklung der Granula und den die Entwicklung der Vacuolen begünstigenden Umständen an.

Ein Beweis für die Zusammengehörigkeit von Vacuolen und Körnchen scheint mir darin zu liegen, dass an jenen Zellen, an welchen mehrere Vacuolen sichtbar waren, die Anordnung der Körnchen eine gewisse Regelmässigkeit zeigte.

Abgesehen davon, dass jede der Vacuolen von einem Kranz von Körnchen umgeben ist, erscheinen die Körnchen in dem die Vacuolen trennenden Raume stärker angehäuft.

Wenn eine grössere Vacuole Einschnürungen zeigt, so liegen an der Einschnürungsstelle regelmässig ziemlich grosse, sich intensiv färbende Körnchen.

Wenn die Sprossung beginnt und in der Tochterzelle eine Vacuole auftritt, so sieht man, dass der Plasmatheil, welcher die Mutterzelle mit der Tochterzelle verbindet, Körnchen enthält; man kann sich des Gedankens nicht erwehren, dass auf dieser Strasse die Körnchen aus der Mutterzelle in die Tochterzelle eintreten.

Einige Beobachtungen, welche ich an meinen Präparaten machen konnte, lassen es nicht unwahrscheinlich sein, dass der Austritt von Körnchen aus der Mutterzelle ein Vorstadium der Sprossung sei; die Körnchen legen sich hart an den Rand der Mutterzelle an und scheinen nachträglich weiteres Plasma zu bekommen.

Ganz ähnliche Resultate wie die Untersuchung der in der gefärbten Bierwürze zur Entwicklung gelangten Sprosspilzzellen ergab die isolierte Färbung mit Methylgrün oder mit Benzopurpurin.

Zu diesem Zwecke muss eine concentrirte wässrige Lösung des Farbstoffes verwendet und nur auf wenige Secunden mit den lebenden Saccharomyceten in Verbindung gebracht werden; eine sehr geringe Menge der gefärbten Zellen wird darauf in reines Wasser gebracht und in diesem untersucht. Das Protoplasma der Zellen zeigt noch keine Färbung, nur die Körnchen am Rande der Vacuole oder innerhalb der Vacuole, sowie die Körnchen, welche aus der Zelle auszutreten im Begriffe sind, erscheinen tingiert.

Lässt man aber die Hefe längere Zeit mit der Farbe in Verbindung, so tingiert sich auch das Plasma der Zelle; dabei sieht man aber, dass dann auch andere Körnchen gefärbt erscheinen, wobei freilich die Körnchen an der Wand der Vacuole durch einen viel dunkleren Farbenton auffallen.

Eine andere Färbungsmethode, welche eine isolierte Färbung der Körnchen erlaubt, ist das Congoroth. Auch dieses darf nur kurze Zeit mit den Hefezellen in Verbindung sein und muss entsprechend concentrirt zur Verwendung kommen. Die oben angegebene Eigenschaft des Congoroths, sich beim Vorhandensein von Salzsäure blau zu färben, ermöglicht es, eine weitere Reaction auszuführen, die aber nur bei sehr vorsichtiger Ausführung gelingt, da sehr leicht ein Niederschlag von blauem Farbstoff entsteht, welcher das ganze Bild stört. Die Art und Weise, wie ich noch verhältnismässig am häufigsten diese Reaction erhielt, ist folgende: Man bringt die lebenden Zellen auf 24 Stunden in eine wässrige Congorothlösung von mässiger Concentration, hebt mit der Platinöse ein Tröpfchen des gefärbten Hefebreies heraus, vertheilt es in mit Salzsäure angesäuertem Wasser, bringt ein Pröbchen dieser Aufschwemmung in reines Wasser und untersucht. Neben Farbstoffniederschlag findet man auch Zellen, in welchen die am Rande der Vacuole und die innerhalb der Vacuole liegenden Körnchen blau erscheinen.

## Deutung der Befunde.

Für die Deutung der in den Hefezellen vorkommenden Körnchen und Vacuolen sind nun zwei Möglichkeiten vorhanden; entweder sind sie entsprechend der R a u m'schen Annahme nichts anderes als paraplastische Einschlüsse, oder es kommt ihnen eine vom Protoplasma verschiedene Natur zu.

Die Entscheidung dieser Frage muss auf mikrochemischem Wege versucht werden.

Die Untersuchungen von Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> und von A. Kossel<sup>2)</sup> haben den Nachweis geliefert, dass die Hefe Nuclein enthalte, also eine Substanz, die man als den specifischen Kernstoff ansieht. Auf Grund dieser Angaben hat De Bary<sup>3)</sup> das Vorhandensein des Kernes der Hefezelle schon aus dem Vorkommen von Nuclein in derselben geschlossen.

Dagegen bemerkte Wiesner<sup>4)</sup>, dass dieser Schluss deshalb nicht richtig sei, weil Nuclein auch in Körpern vorkomme, in welche es nicht von Zellkernen aus gelangt sein könne, und Krasser<sup>5)</sup> berief sich darauf, dass Nuclein z. B. auch in der Milch vorkomme, in welche es gewiss nicht von Zellkernen gekommen sei.

Dem entgegen hat Nissen<sup>6)</sup> den Nachweis geliefert, dass das Nuclein der Milch von den Zellen der Milchdrüsen

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler: Medicinisch-chemische Untersuchungen, IV. Heft, p. 486.

<sup>2)</sup> A. Kossel: Zeitschrift für physiologische Chemie 1881, Band III, p. 286.

<sup>3)</sup> De Bary: vergl. Morphologie der Pilze etc. Leipzig 1884.

<sup>4)</sup> Wiesner: Die Elementarstructur und das Wachsthum der lebenden Substanz. Wien 1892, p. 264.

<sup>5)</sup> F. Krasser: Oesterr. bot. Zeitschrift 1885, p. 375.

<sup>6)</sup> Nissen: Archiv. f. mikr. Anat. 26. Band, III. Heft, 1886.



herstamme, und die heutige Ansicht geht nach den ausgezeichneten Untersuchungen von Frank Schwarz <sup>1)</sup> dahin, dass das Nuclein nur von Kernsubstanzen her stammen könne.

Aus den beiden Thatsachen, dass einerseits das Nuclein in den Hefezellen nachgewiesen wurde, und dass andererseits das Nuclein in seinem Vorkommen an das Vorhandensein von Kernsubstanzen gebunden ist, ergibt sich mit zwingender Nothwendigkeit der Schluss, dass in den Hefezellen die specifische Kernsubstanz vorhanden ist.

Leider kennt man, wie Krasser <sup>2)</sup> hervorgehoben hat, noch keine specielle Nucleinreaction, und man muss sich damit begnügen, das Verhalten der zu untersuchenden Substanz gegenüber bestimmten Farbstoffen zu prüfen, da schliesslich auch die Tinctionen nichts anderes als mikrochemische Reactionen sind. Die Untersuchungen, welche Zacharias <sup>3)</sup> ausgeführt hat, haben mit Sicherheit ergeben dass Nucleinkörper in den Hefezellen durch gewisse Reactionen sichtbar zu machen sind. Doch hat bisher der Nachweis gefehlt, welche Formationen der Hefezelle als Nucleinsubstanz angesprochen werden können.

Die Nucleinkörper zeichnen sich, wie auch Zacharias hervorhebt, dadurch aus, dass sie den Farbstoff zuerst in sich aufspeichern, und dass derselbe sich aus ihnen wieder schwieriger entfernen lässt als aus dem übrigen Zellinhalt. Bei längerer Einwirkung der Farbstoffe, welche bei kurzer Einwirkung nur das Nuclein färben, färbt sich aber auch das ganze Protoplasma. Daraus ergibt sich, dass die Lösung der Frage, ob wir in der Lage sind, den Körnchen in der Hefezelle die Nucleinnatur zuzuschreiben, nur durch die im vorhergehenden beschriebene isolierte Färbung der Körnchen zu erzielen ist.

Aus den früher beschriebenen Ergebnissen der Färbungen geht hervor, dass den am Rande der Vacuole und innerhalb derselben liegenden Körnchen nicht dieselbe chemische Natur zuzuschreiben ist, wie den im übrigen Plasma sichtbar werdenden Körnchen. Diese beiden Arten von Körnchen verhalten sich den Reagentien gegenüber nicht gleich; so verschwinden beim Zusatz von reiner concentrirter Salzsäure die Körnchen am Rande der Vacuole und lassen sich mit Methyl-

1) F. Schwarz: Die morpholog. u. chem. Zusammensetzung des Protoplasmas, p. 78, (Cohn's Beiträge z. Biologie d. Pflanzen. V. Band, 1. Heft Breslau 1887.

2) Krasser: l. c.

3) Zacharias: l. c. p. 284.

grün nicht mehr färben, während die übrigen Körnchen im Plasma in Folge der Salzsäurewirkung deutlich hervortreten. Meine diesbezüglichen Untersuchungen lassen mich der Krasser'schen Angabe beitreten, dass die im Plasma vertheilten Körnchen kein Nuclein enthalten. Diese Beobachtung ist vielleicht geeignet, mancherlei Widersprüche zu erklären, welche in den verschiedenen Arbeiten über die Natur der Körnchen auftreten.

Eine weitere Identitätsreaction ist die Behandlung mit künstlichem Magensaft. Nuclein gehört nach den Angaben von Zacharias <sup>1)</sup> zu den nicht peptonisierbaren Substanzen, da es bei der Verdauung mit pepsinhaltigen Flüssigkeiten zurückbleibt. Eine mehrstündige Einwirkung des Magensaftes bei der Temperatur des menschlichen Körpers lässt, wie ich schon anfangs bemerkt habe, die Zellen wie gequollen erscheinen; wenn man aber die so peptonisierte Hefe mit Methylgrün behandelt, so erhält man wieder die Grünfärbung der an der Wand der Vacuole liegenden Körner; das übrige Plasma erscheint diffus gefärbt und lässt keine Körnchen mehr hervortreten.

Ich stand nun wie Krasser vor der Alternative, entweder so viele Zellkerne anzunehmen als nach der Peptonisierung färbbare Körnchen zurückblieben, oder zu sagen, es sei kein Zellkern nachweisbar und das Nuclein sei im Zellprotoplasma vertheilt. Krasser entschied sich für das letztere. Ich nun möchte meiner Ansicht dahin Ausdruck geben, dass auch ich das Vorhandensein eines Zellkernes im gewöhnlichen Sinne des Wortes in Abrede stelle, dass ich aber annehme, dass rings um die Vacuole und theilweise in der Vacuole bestimmt localisierte Kernsubstanz vorhanden sei, und dass ein gewisser innerer Zusammenhang zwischen den Vacuolen und den Nucleinkörperchen bestehe.

Schon Auerbach <sup>2)</sup> hat in Bezug auf die allgemeine Entstehung des Zellkernes die Ansicht aufgestellt, „dass der Zellkern bei seiner Neubildung ursprünglich nichts anderes ist, als eine Art Vacuole, genauer gesagt, als ein Tropfen eines vom Protoplasma verschiedenen klaren Fluidums, welches ohne besondere Umhüllung eine entsprechende Höhle im Protoplasma ausfüllt“.

<sup>1)</sup> Zacharias: Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkernes. Bot. Zeitung 1882.

<sup>2)</sup> Auerbach: Organologische Studien. Heft II., p. 238.

Auch Hofmeister<sup>1)</sup> fasste die Bildung des Zellkernes als eine Trennung auf, welche die eiweissreichsten Theile des Protoplasmas von dessen übriger Substanz erfahren, und meinte, dass diese Theile im Innern des Protoplasmas zu einem Tropfen zusammentreten.

In ähnlicher Weise könnte man sich vorstellen, dass die Vacuolen im Inneren der Hefezellen diesen Tropfen entsprechen, und dass die an ihrem Rande sichtbaren Nucleinkörnchen die Bildung eines eigentlichen Kernes anbahnen sollen.

Die Vacuolen sammt den ihnen anhängenden, sowie den in ihnen befindlichen Körnchen würden dann als ein Vorläuferstadium der Kernentwicklung anzusehen sein, und wir müssten die Zellen der Saccharomycesarten für Individuen halten, welche auf einem sehr frühen Zustande der phylogenetischen Entwicklung der Zelle stehen geblieben sind.

Auch Wiesner<sup>2)</sup> hält die Hefezellen für hochentwickelte Repräsentanten jener Form, welche schon den frühesten Organismen eigen war. Nun schreibt Wiesner aber den Hefezellen ein Archiplasma zu, also einen Zelleib, welcher die Eigenschaften des Kerns und des Protoplasmas in sich vereinigt, weil der specifische Kernstoff im allgemeinen Protoplasma der Hefezellen vertheilt ist.

Ich hingegen glaube, dass die Hefezellen nicht auf dieser ersten, sondern bereits auf einer höheren Stufe der Zellentwicklung stehen, bei der sich im Protoplasma bereits eine Vacuole gebildet hat und Kernsubstanzen auftreten. Diese sind allerdings vorderhand von einander noch räumlich getrennt, zeigen aber schon das Bestreben, sich miteinander zu verbinden und zu einem dem Zellkerne der höheren Zellen entsprechenden Gebilde zu werden.

Zum Schlusse möchte ich noch die Resultate meiner Untersuchungen in einigen Sätzen zusammenfassen:

I. Die Hefezellen sind phylogenetisch tief stehende Organismen, welche keinen Kern im eigentlichen Sinne des Wortes besitzen, in deren Protoplasma aber bestimmt charakterisierte Kernsubstanzen auftreten.

<sup>1)</sup> Hofmeister: Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig 1867, p. 80.

<sup>2)</sup> Wiesner l. c. p. 266.

II. In der Hefezelle kommen zwei von einander chemisch differente Arten von Körnchen vor, von denen die eine Art als Kernsubstanz, die andere als Protoplasmasubstanz anzusehen ist.

III. Die Kernsubstanzen stehen mit den im Innern der Hefezellen befindlichen Vacuolen in inniger Verbindung; sie liegen zumeist hart am Rande der Vacuolen, theilweise auch im Inneren derselben; durch Confluieren der Körnchen können kernähnliche Figuren entstehen.

IV. Die im Innern der Vacuolen liegenden Kernsubstanzen sind mit lebhafter Eigenbewegung ausgestattet.

V. Bei der Theilung der Vacuolen ordnen sich die Körnchen in regelmässige Gruppen, so dass jede Tochtervacuole einen eigenen Kranz von Körnchen besitzt.

VI. Auch die im Protoplasma vertheilten Kernsubstanzen besitzen die Fähigkeit der Bewegung und vermögen den Zellleib zu verlassen.

VII. Bei der Sprossung gehen aus der Mutterzelle die Körnchen in die Tochterzelle über und bilden so die Grundlage für die Lebensthätigkeit der neuen Zelle.

VIII. Den Kernsubstanzen kommt der chemische Charakter des Nucleins zu.



UB Wien



+AM505848909



