

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN DER THERMALALGE
MASTIGOCLADUS LAMINOSUS COHN.

Mit 1 Textfigur und 6 Tafeln

E. MARČENKO

(Aus dem Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb, Physikalisch-chemische Abteilung,
Laboratorium für Elektronenmikroskopie)

INHALTSÜBERSICHT

I. Einleitung	48
II. Allgemeines über den Bau der <i>Cyanophyceenzelle</i>	48
III. Material und Methoden	49
IV. Eigene Untersuchungen	52
A. Bemerkungen zum Bau des Thallus	52
B. Plasmolytische Versuche	54
C. Zellbau	56
1. Zentroplasma	56
2. Chromatoplasma (Bau und Trockengewicht)	57
3. Zelleinschlüsse	59
a) Volutin	59
α) Nachweis und Morphologie der Volutinkörner	59
β) Bildung des Volutins in Abhängigkeit von den Kultur- bedingungen	60
b) Cyanophycin	61
4. Membranbildungen (Morphologie und Chemismus)	63
D. Hitze-, Kälte- und Trockenresistenz	66
V. Zusammenfassung	67
VI. Literatur	68
VII. Tafelerklärung	72

I. EINLEITUNG

Die Anregung zu der vorliegenden Arbeit verdanke ich Herrn Prof. Dr. V. Vouk, dem Vorstand des ehem. Institutes für experimentelle Biologie der Jugoslawischen Akademie in Zagreb, wo ich auch die ersten Beobachtungen und Versuche angestellt habe. Der wesentliche Teil der Untersuchungen wurde im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Institutes »Ruđer Bošković« durchgeführt. Dem Leiter des Laboratoriums Herrn Prof. Dr. Z. Devidé danke ich bestens für die bereitwillige Unterstützung bei der Arbeit. Für Mithilfe bei elektronenmikroskopischen Arbeiten danke ich auch Frau Dr. M. Wrischer, Assistentin des Institutes »Ruđer Bošković«.

In neuerer Zeit erschienen mehrere Arbeiten über verschiedene Untersuchungen an Cyanophyceen. Die Zellorganisation dieser Gruppe von Algen ist noch vielfach ungeklärt und es gibt noch keine eindeutige Auffassung über den Bau ihrer Zelle. Im Rahmen der Untersuchungen von Thermen und Thermalorganismen erschien es interessant die Cytologie einer typischen Thermalalge zu erforschen. Als Untersuchungsobjekt wurde *Mastigocladus laminosus* Cohn. gewählt, der gemeinsam mit *Phormidium laminosum* (Ag.) Gom. in Thermalquellen mit Temperaturen von 44 bis 65° C (»Akrothermen« nach Vouk, 1950) der ganzen Welt vorkommt und als kosmopolitisch bezeichnet werden kann. Es wurde versucht diese Alge von möglichst vielen Standpunkten zu untersuchen und festzustellen ob und wieweit sich ihre Organisation von den nicht-thermalen Cyanophyceen unterscheidet.

II. ALLGEMEINES ÜBER DEN BAU DER CYANOPHYCEENZELLE

Nach unserem heutigen Wissensstand liegt bei Cyanophyceen eine primitive Zellorganisation ohne Differenzierung des Protoplasten in Zellkern, Plasten und Cytoplasma vor. Der Protoplast besteht nur aus einem pigmenthaltigen Chromatoplasma und einem farblosen Zentroplasma, die gegenseitig nicht scharf abgegrenzt sind. Das Chromatoplasma zeigt eine submikroskopische lamellare Struktur (Drews und Niklowitz 1956a u. b, 1957a u. b, Schinke und Ueda 1957, Elbers, Minnaert und Thomas 1957, Drawert und Metzner 1958, Fuhs 1958, Lefort 1960 a u. b, Hopwood und Glauert 1960, Ris und Singh 1961). Der submikroskopische Bau des Zentroplasmas, das oft auch als Kernäquivalent bezeichnet wird (Krieg 1954, Cassel und Hutchinson 1955, Fuhs 1958a, Hopwood und Glauert 1960) ist noch nicht befriedigend gelöst, obschon dauernd Versuche in dieser Hinsicht unternommen werden (Fuchs 1958a, Hopwood und Glauert 1960). Mit Sicherheit sind bisher nur zwei Arten von Einschlüssen nachgewiesen worden: die metachromatischen polyphosphathaltigen Volutinkörner und die sogen. Cyanophycinkörner. Ihre Struktur wurde auch elektronenmikroskopisch abgebildet (Fuhs 1958c, Hopwood und Glauert 1960), aber ihre Rolle im Leben der Zelle scheint noch unklar zu sein. Es gibt kein Vacuolensystem im Sinne der höheren Pflanzen und dementsprechend auch keinen Zellsaft. Die Bildung der

Vacuolen wird meist als pathologisch gedeutet (Geitler 1936). Mehrfach sind Reaktionen, die auf Oxydation-Reduktions-Zentren der Zelle weisen, erfolgreich durchgeführt worden (Drews 1955, Drews und Niklowitz 1956b, Tischer 1957, Fuhs 1958, Drawert und Metzner 1958). Die Membranbildungen sind bei verschiedenen Arten sehr mannigfaltig gebaut und die chemische Zusammensetzung derselben ist nicht einheitlich (Metzner 1955, Schulz 1955, Frey-Wysling 1959. Bezüglich der älteren Literatur verweise ich auf die Arbeit von Metzner 1955. Über den submikroskopischen Bau der Cyanophyteenmembranen berichten ebenfalls Drews und Niklowitz 1956a, Fuhs 1958b, Hopwood und Glauert 1960, Ris und Singh 1961).

Zusammenfassende und kritische Darstellungen des jeweiligen Wissenstandes über den Zellbau der Blaualgen wurden von mehreren Forschern veröffentlicht, unter welchen vor allem folgende zu nennen wären: Gomont (1893), Baumgärtel (1920), Poljansky und Petruschewsky (1929), Tunmann (1913), Guilliermond (1933), Geitler (1932 und 1936), Elenkin (1936), Fritsch (1945) und Drawert (1949).

III. MATERIAL UND METHODEN

ALLGEMEINES

Mastigocladus laminosus Cohn von der Thermalquelle in Topusko (Standorttemperatur 56°C) wurde im Lichtthermostaten bei 48—52°C artrein, aber nicht bakterienfrei, kultiviert. Bakterienfreie Kulturen wurden angestrebt, doch ohne Erfolg, da die Alge schwer von Bakterien zu befreien ist. Sofern einzelne Hormogonien bakterienfrei isoliert wurden, scheiterte die Kultur, da sich aus einzelnen Fäden die Kulturen nicht anlegen liessen. Nur einmal konnte aus einer einzelnen Zelle eine Kultur gewonnen werden, aber auch sie war leider nicht bakterienfrei. Ris und Singh (1961) geben an, dass sie *Mastigocladus laminosus* bakterienfrei bei 23°C kultiviert haben. *Mastigocladus* aus der Therme Topusko liess sich bei Zimmertemperatur jedoch kaum kultivieren.

Als Nährlösung wurde die Lösung Nr. 10 von Chu (nach Rodina 1956), zubereitet mit einem Zusatz von 1—10% Erdabkochung (nach Pringsheim 1954), verwendet. Für Versuche über Volutinbildung diente reine Chu-Lösung mit oder ohne Zugabe von 1% Erdabkochung.

Das Wachstum der Alge wurde durch eine vorhergehende Homogenisierung des Lagers im Rührgerät oder in der Reibschale bedeutend gefördert.

Die Fixierung der Zellen für lichtmikroskopische Zwecke erfolgte meistens in absolutem oder 96%igem Alkohol, 2%iger OsO₄-Lösung, Formol (einige Tropfen 40%igen Formols auf 10 ccm Wassers), 10%igem Formol mit 1% CaCl₂-Zusatz, Carnoy- und Chabaud-Gemisch.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde das Material in 1%igem OsO₄ im Veronalacetatpuffer bei pH 7,2—7,4 mit 0,15—0,3 M Saccharosezusatz fixiert, mit Alkohol dehydriert, in Methacrylat eingebettet und nach dem Verfahren von Devidé und Wrischer (1960) bei 70°C polymerisiert. Eine kontrastreiche Darstellung der Cyanophycinkörner wurde durch das Einlegen des Materials nach der OsO₄-Fixierung in warme Carminessigsäure (50°C) zu erzielen versucht. Die Schnitte wurden mit dem Reichert Ultramikrotom nach H. Sitte angefertigt. Die Beobachtungen und Aufnahmen der Präparate erfolgten mit dem elektrostatischen Elektronenmikroskop Trüb, Täuber & Co, Modell KM-4.

SPEZIELLE VERFAHREN FÜR LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Darstellung der Volutingrana

Färbung mit basischen Farbstoffen. Methylenblau, Toluidinblau, Neutralrot, Pyronin, Rutheniumrot, Nilblau, Azur I, basisches Fuchsin in wässrigen Lösungen (1:1000) färben das in alkoholfixierten Zellen enthaltene Volutin »Rote Körner« von Bütschli 1890, »Zentralkörner« von Kohl 1903, »Metachromatin« von Guilliermond 1906, »Epiplasten« von Baumgärtel 1920, »basophile Körper« von Bringmann 1950, »Polyphosphatgrana« von Fuhs 1958) sehr gut. Für Vitalfärbungen von Volutin wurde Nilblau (1:10.000) mit Phosphatpuffer (pH 6,3 und höher) verwendet. Die Volutinfärbung nach Meyer (1904) mit Methylenblau oder (modifiziert) mit Toluidinblau und Differenzierung in 1%iger Schwefelsäure diente zum Volutinnachweis.

Polyphosphatnachweis. Der Polyphosphatnachweis wurde durch Bleifällung nach Ebel und Colas (cit. nach Fuhs 1958) sowie durch Silberfällung nach Bringmann (1952) durchgeführt. Die zweite Methode zeigte sich jedoch nicht immer als verlässlich.

Darstellung der Zentroplasmastruktur

Nuklealfärbung nach Feulgen. Fixierung in 96%igem Alkohol oder Carnoy-Gemisch 15 Minuten (das Material wurde kontrollweise auch 24 Stunden in Alkohol gehalten um die Plasmalreaktion auszuschliessen), Hydrolyse in nHCl bei 60°C 5—8 Minuten, kurzes Ausspülen in kalter nHCl und destilliertem Wasser, Färbung im Feulgen'schen Reagens 3 Stunden, Waschen in SO₂-Wasser 3 mal je 5 Minuten.

Färbung nach Giemsa. Fixierung in 96%igem Alkohol 5—15 Minuten oder 2 Minuten in OsO₄-Dämpfen, Auswaschen in destilliertem Wasser, Färbung in Giemsa-Lösung 5—20 Minuten (bereitet nach Romeis 1948, für Ausstriche, aus 10 ccm gekochtem destilliertem Wasser und 0,3 ccm konzentrierter Giemsa-Lösung) mit vorhergehender Hydrolyse in nHCl bei 60°C 8 Minuten oder ohne Hydrolyse.

Färbung in Azur I-Thionylchlorid nach De Lamater (1951). Fixierung in 96%igem Alkohol, Ausspülen in Wasser, Färbung in Azur I-Thionylchlorid (bereitet nach De Lamater 1951) 15 Minuten, mit und ohne vorhergehende Hydrolyse in nHCl (8 Minuten bei 60°C).

Färbung in eisernem Coelestinblau nach Pickle und Gray (1957). Fixierung in 96%igem Alkohol, Carnoy- oder Chabaud-Gemisch 15 Minuten, oder Einwirkung des Färbegemisches (bereitet nach Pickle und Gray 1957, pH 0,8) auf unfixierte Zellen. Das Färbegemisch muss frisch zubereitet werden. Dauer der Einwirkung: 5 Minuten bis 24 Stunden.

Färbung mit Galloicyaninchromalaun. Die Farbe wurde nach Romeis (1948) bereitet. Fixierung in 96%igem Alkohol, Ausspülen in Wasser, Färbung in Galloicyaninchromalaun 24 Stunden.

Methoden für die Extraktion der Nucleinsäuren

Fixierung in 96%igen Alkohol, Ausspülen in Wasser, Extraktion in 5—10%iger Trichloressigsäure 15—20 Minuten bei 90°C oder in 5—10%iger Perchlorsäure 15—25 Minuten bei 60—70°C. Dieses Verfahren extrahiert gemäss den Angaben bei Cowden (1957) und Spiekermann (1957) DNS und RNS aus der Zelle.

Darstellung der Cyanophycinkörner

Färbung in Carminessigsäure. Lebende Fäden wurden in Carminessigsäure 5 Minuten bei 50°C erwärmt. Das Cyanophycin färbt sich tief rot bzw. bei Anwesenheit von Eisen bläulichrot bis olivenfarbig.

Färbung mit sauren Farbstoffen. Saure Farbstoffe (Eosin, Säurefuchsin, Kongorot, Benzopurpurin) wurden in Verdünnung 1:1000 verwendet. Das pH war mit Phosphatpuffer (nach Strugger 1949) auf 2,2 gestellt oder es wurden Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt. Die Farbstoffe wirkten auf Formol-CaCl₂-fixierte Zellen (Fixierungsdauer 24 Stunden) 20 Minuten bis 24 Stunden lang.

Baker's Test für Phospholipide

In allem wurde nach den Angaben der Originalarbeit von Baker (1946) verfahren. Die Differenzierung in der Borax-Kaliumhexacyanoferrat-Lösung konnte weggelassen werden.

Nadi Reaktion auf »Oxydasen«

Das Nadi-Gemisch bereitet nach Glick (1949), wirkte ca 30 Minuten auf lebende Zellen ein. Bei einer positiven Reaktion treten in den Zellen blaue Körnchen hervor.

Färbung mit Janusgrün

Janusgrün in Nährlösung (1:10.000—1:100.000) wurde 5 Minuten — 5 Stunden lang auf lebende Zellen bei Luftsauerstoffzutritt einwirken gelassen.

Darstellung der Membran

Freilegung der Eigenmembran. Die Freilegung der Eigenmembran wurde durch eine Behandlung mit 0,3%iger Pepsinlösung in 0,2%iger HCl bei 37°C in 3—5 Tagen oder mit 30%iger Chromsäure in 48 Stunden erzielt. Die Behandlung mit Pepsin ist vorzuziehen, da sie schonender auf die Fäden wirkt als die Chromsäure.

Darstellung der Membranporen (nach Metzner 1955). Die Behandlung der lebenden oder alkohol-fixierten Fäden erfolgte in 30%iger Chromsäure. Die Einwirkungszeit musste von 19 auf 48 Stunden verlängert werden. Die bearbeiteten Fäden wurden auf dem Objektträger unter dem Deckglas zerdrückt und die zerdrückte Masse mit einem Tropfen destillierten Wassers auf die Trägerfolien aufgetragen.

Nachweis der Pektine. Behandlung mit Perhydrol. Die Behandlung erfolgte mit 5%igem H₂O₂ bei 50°C 2 bis mehrere Stunden. Die Pektine werden dabei abgebaut.

Färbung mit verdünnten Lösungen von Rutheniumrot und Methylenblau. Dem Rutheniumrot wurde etwas verdünntes Ammoniak zugesetzt. Die Pektine färben sich rot bzw. blau.

Reaktionen auf Zellulose. Färbung mit Chlorzinkjod. Zellulose wird mit Chlorzinkjod dichroitisch blau bis violett gefärbt. Für die Membran der Heterocyste von *Mastigocladus laminosus* musste eine vorhergehende Einwirkung mit H₂O₂, Eau de Javelle oder Chloralhydrat vorgenommen werden.

Bearbeitung mit Kupferoxydammoniak. Das Reagens wurde durch Auflösung von reinem Kupfer im konzentrierten Ammoniak bei Luftsauerstoffzutritt hergestellt. Die Zellulose wird im Reagens aufgelöst.

Die Analyse im Polarisationsmikroskop

Die polarisationsmikroskopische Analyse erfolgte mit der Leitz'schen Polarisationsvorrichtung nach Schmidt. Die Messungen der Gangunterschiede wurden mit dem Sénarmont'schen Kompensator in monochromatischem Licht (Grünfilter $\lambda = 550 \text{ m}\mu$) durchgeführt.

Das Verfahren für »Plasmodesmen« nach Kohl

Das Verfahren wurde nach den Angaben von Geitler (1936) ausgeführt.

Vitalfärbung mit Fluorochromen

Die Vitalfärbung mit Auramin und Berberinsulfat (1:10.000) erfolgte in Leitungswasser und in destilliertem Wasser mit Phosphatpufferzusatz (Struuger 1949) im Bereich pH 2,2—11 wobei die lebenden Zellen 5 Minuten bis 1 Stunde lang gefärbt wurden.

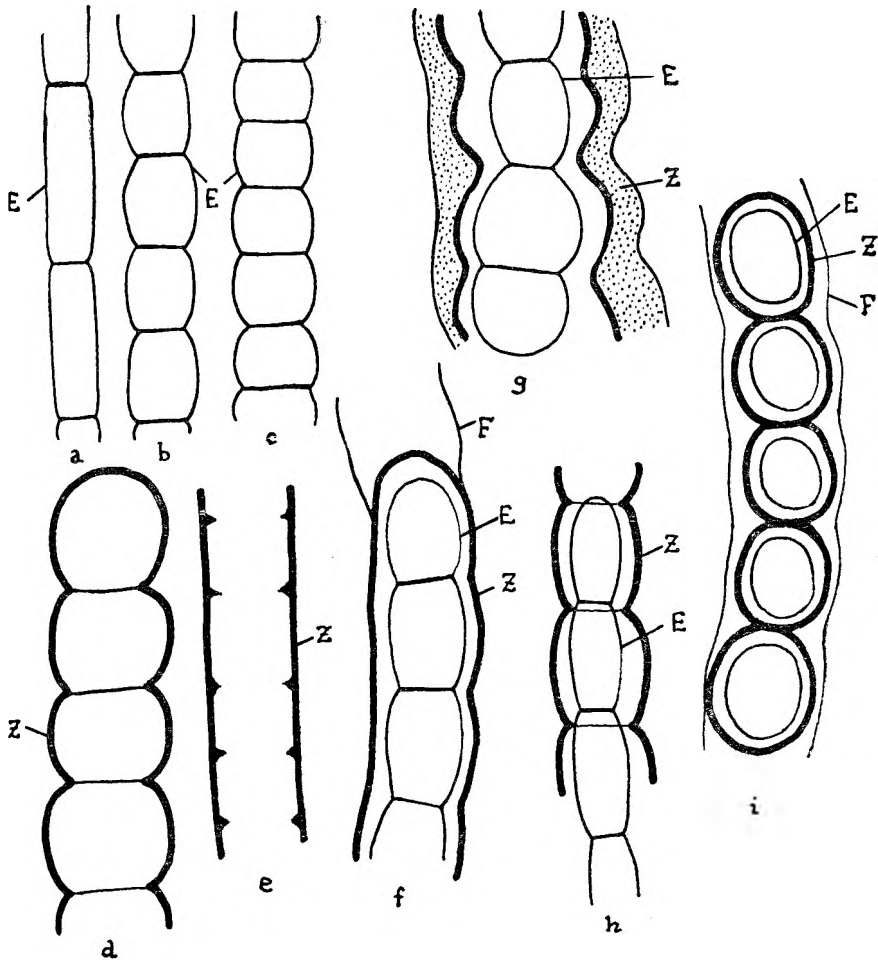
IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. BEMERKUNGEN ZUM BAU DES THALLUS

Mastigocladus laminosus ist durch seinen einzigartigen Formenreichtum besonders charakterisiert (Abb. 1, 2, Taf. I; Abb. 3, 4, 5, 6, Taf. II). Dieser Polymorphismus brachte Schwabe (1944) zur Schlussfolgerung, dass es sich um eine »Uralge« handelt, die die für verschiedene Cyanophyceengruppen (*Chroococcales*, *Scytonematales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*) charakteristischen morphologischen Eigenschaften in verschiedenen Stadien vereinigt. Heute hat man allgemein die von Boye-Petersen auf Grund des islandischen Thermalmaterials aufgestellten drei Formen anerkannt (Geitler 1932). Das sind: 1. forma *typica* (mit Verzweigungen), 2. f. *anabaenoides* (ohne Verzweigungen mit Heterocysten) und 3. f. *phormidioides* (ohne Verzweigungen und ohne Heterocysten). Wie die Beobachtungen der Alge in der Kultur und am natürlichen Standort zeigen, können diese Formen nicht als taxonomische Einheiten (Varietäten) wie Copeland (1936) annimmt, sondern nur als Entwicklungsstadien der Alge aufgefasst werden. In der Kultur kann man bezüglich des Alterns der Fäden verschiedene Stadien verfolgen. Das Jugendstadium umfasst die Hormogonien, die bei *Mastigocladus* erst von Schwabe (1944) beschrieben wurden. In allen heute verwendeten Bestimmungsschlüsseln der Cyanophyccen, auch in den neueren — siehe z. B. Hollerbach, Kossinskaja, Poljanskij (1953) — finden wir noch immer für *Mastigocladus* die Angabe: »Hormogonien unbekannt«. Später werden die Zellen mit einer Scheide umhüllt, die mit dem Alter derber wird (Zellscheide, siehe Textfig. 1). Alle möglichen Übergänge zwischen den von Boye-Petersen aufgestellten drei Formen kommen dabei vor. Heterocysten werden meist bei älteren oder unter ungünstigen Bedingungen kultivierten Algen in grösserer Zahl gebildet.

Die aufgerollten Fäden (Abb. 1, 2, Taf. I), die ich als »status *circinatus*« bezeichnen will (nach Freymy (1936) als »subforma *circinata*« beschrieben), kommen in den an Gasblasen reichen Oberflächenhäutchen der Lager sowohl in der Kultur als auch an den thermalen Standorten vor. Solche Aufrollungen sind nicht für *Mastigocladus laminosus* charakteristisch, denn sie kommen in denselben Fällen z. B. auch bei *Phormidium laminosum* vor.

In alten Fäden kommt es zu einer besonders ausgeprägten Einschnürung der Zellen an der Querwänden, indem die Sekundärmembran sich verdickt und die Zellen von allen Seiten zu umhüllen beginnt, bis sie diese nicht auseinandersprengt. Das Resultat ist ein Zerfall des Fadens



Textfig. 1. Membranbildungen von *Mastigocladus laminosus* Cohn.

a, b und c) durch Pepsin-Salzsäurewirkung isolierte Eigenmembranen.

d, e) verschiedene Zellscheideformen.

d) Tonnenform in Aufsicht e) Zylinderform in optischem Schnitt.
f) Faden in Formol fixiert. Der Protoplast mit der Eigenmembran ist innerhalb der Scheide geschrumpft. Zellscheide ohne Andeutung von ringförmigen Querwänden; am oberen Ende ist die Fadenscheide deutlich erkennbar.

h) Formol-fixierter Faden, der Protoplast mit der Eigenmembran hat sich innerhalb der Scheide (infolge des Druckes auf das Deckglas!) verschoben.

i) Dauerzellen. Innerhalb der Fadenscheide befinden sich Zellen mit deutlich sichtbarer Zellscheide und Eigenmembran.

g) Einwirkung von Pepsin-Salzsäure auf den Faden; die Zellscheide ist verquollen.

E = Eigenmembran Z = Zellscheide F = Fadenscheide

auf einzelne Dauerzellen. Diese Dauerzellen waren grösser als die gewöhnlichen vegetativen Zellen, der Inhalt war aber nicht braun, sondern blieb grün.

Als ein besonders interessantes Dauerstadium soll das von mir als »status *microcystoides*« (Abb. 6, Taf. II; Abb. 10, Taf. III) bezeichnete Stadium hervorgehoben werden. Es besteht aus einzelnen kugelförmigen oder elipsoidalen Zellen verschiedener Grösse. Im Freilandmaterial kommt es meistens mit anderen Formen gemeinsam vor. Es wurde isoliert und eine Kultur aus einer einzelnen Zelle mit Erfolg angelegt. Dieser status wurde drei Jahre lang kultiviert, es kam aber nur zur Bildung kurzer Hormogonien, niemals aber langer oder typisch verzweigter *Mastigocladus*-Fäden. Man könnte glauben, es handle sich um eine *Microcystis*- oder *Synechocystis*-art, aber die grosse Variabilität der Dimensionen und der Übergang in kurze fädige Hormogonien sprechen dagegen. Dieses Stadium zeigte eine grössere Resistenz gegen äussere Faktoren als die normalen *Mastigocladus*-Fäden.

In sehr konzentrierten Nährmedien wurden abnormal grosse Zellen mit braunem Inhalt gebildet (Abb. 5, Taf. II), die mit Jod eine starke Braunfärbung gaben (Glykogennachweis), aber keine verdickte Membran besaßen. Sie könnten demnach auch als ein besonderes Dauerstadium aufgefasst werden.

B. PLASMOLYTISCHE VERSUCHE

Die Plasmolysierbarkeit der *Cyanophyceen* wird bekanntlich bezweifelt, da bei ihnen kein normales Vacuolensystem besteht und keine allseitige Abhebung des Protoplasten von der Membran erreichbar ist. P e r n a u e r (1958) konnte jedoch die von ihr erzielte Plasmolyse als einen vitalen Vorgang deuten.

Wenn *Mastigocladus* in eine hypertonsche Lösung gebracht wird, erfolgt eine der Abhebung des Protoplasten von der Zellwand vorangehende allgemeine Verkürzung und Krümmung der Fäden (Abb. 25, Taf. IV). Die Trichome verkürzen sich dabei auf 67—79% (Mittelwert von 10 Messungen = 74.4%) der ursprünglichen Länge. Für diese Versuche wurden fast ausschliesslich Hormogonien verwendet, da sie ein sehr homogenes Material darstellen. Die plasmolytische Grenze wurde im Sinne von P e r n a u e r (1958) bestimmt. (Die Messung nach P r á t (1925) konnte nicht in Betracht genommen werden, da bei *Mastigocladus* in Saccharoselösungen selbst nach 24 Stunden keine Deplasmolyse auftrat.) Danach entspricht die plasmolytische Grenze jener Konzentration des Plasmolytikums, welche bei mehr als der Hälfte der Fäden die Abhebung des Protoplasten von der Zellwand erzeugt. Das was immer ein höherer Wert, als jener der die Verkürzung der Fäden hervorrief. Für die Komparation wurden zwei andere Hormogonienarten herbeigezogen: eine nichtthermale Süsswasserart: *Phormidium autumnale* (A. g.) G o m. und eine Meeresart: *Oscillatoria* sp.

Die Plasmolyse konnte nur bei lebenden Zellen in gleichem Grade wiederholt werden. Bei toten bzw. fixierten Zellen kann man oft in hypertotonischen Lösungen ein der Plasmolyse ähnliches Schrumpfen der Trichome (Pseudoplasmolyse nach Prát 1925), in hypotonischen Lösungen dagegen eine an die Deplasmolyse erinnernde Streckung der Trichome erzielen. Meistens handelt es sich um eine Schrumpfung der Trichome ohne einer Abhebung des Protoplasten von der Membran. Doch ändert sich dabei das Permeabilitätsvermögen. So schrumpfen z. B. die Zellen nach Formolfixierung in molarer KNO_3 -Lösung, aber es folgt sogleich die Streckung der Trichome. Dasselbe geschieht in der Saccharoselösung. In der lebenden Zelle erfolgt eine Deplasmolyse in molarer KNO_3 -Lösung jedoch erst nach 15 Minuten, in mol. Saccharoselösung dagegen auch nach 24 Stunden gar nicht. Sehr hohe Konzentrationen von Plasmolytika wirkten letal und erzeugten die Bildung der Nekriden. Von den Nichtelektrolyten wurden Saccharose, Glucose, Glycerin und Harnstoff verwendet. Die Permeabilität für Glucose und Saccharose ist bei *Mastigocladus* schwach, da noch nach 24 Stunden keine Deplasmolyse in den Zellen eintritt. Bei *Oscillatoria* sp. erfolgt die Deplasmolyse aber sofort nach der Plasmolyse. Von den Nichtelektrolyten, die in Betracht genommen wurden, permeiert am schnellsten Glycerin, dann Harnstoff. Glycerin

TABELLE I.

Plasmolyticum	Konzentration des Plasmolyticums (in Gram-Mol) bei Grenzplasmolyse		
	<i>Phormidium autumnale</i> (Süßwasserart)	<i>Mastigocladus laminosus</i> (Thermalart)	<i>Oscillatoria</i> sp. (Meeresart)
NaCl	0.3	0.5	1,1
KNO_3	0.3	0.5	1
CaCl_2	0.1	0.3	0.7
Glucose	0.3	0.5	1
Saccharose	0.3	0.5	1
Harnstoff	0.4	0,7	2
KCNS	0.3	0.5	1,2

permeiert so schnell, dass keine Abhebung des Protoplasten von der Membran zu bemerken ist, sondern nur eine momentane Kontraktion der Fäden. Von Elektrolyten wurde die Wirkung von NaCl, CaCl₂, KNO₃ und Na₂CO₃ untersucht (siehe Tabelle I, S. 55). Die grösste Permeabilität zeigten die Zellen für NaCl, dann KNO₃, weniger für CaCl₂, was aus dem Zeitverlauf, bei dem die Deplasmolyse eintritt, ersichtlich ist.

Molare Na₂CO₃-Lösung wirkt schädlich auf die Hormogonien. Die Zellen desgleichen Hormogoniums zeigen jedoch nicht alle das gleiche Verhalten. In der Mehrzahl der Fälle folgt der Plasmolyse in der gleichen Lösung eine letale Deplasmolyse, wobei der Protoplast eine gelbe Verfärbung zeigt. Vereinzelt bleiben jedoch plasmolysiert und können durch Wasserzusatz wieder deplasmolysiert werden. Diese Zellen können dann neuerdings plasmolysiert werden, während die gelb verfärbten, also offensichtlich getöteten Zellen keine neue Plasmolyse, aber auch keine Pseudoplasmolyse, erleiden können.

Seewasser permeiert in *Mastigocladus*zellen rasch, da nach der Plasmolyse sofort die Deplasmolyse eintritt, während bei *Phormidium autumnale* die Deplasmolyse erst nach einigen Minuten zurückkehrt.

Diese Versuche zeigen, dass *Mastigocladus laminosus* bezüglich des osmotischen Verhaltens an der Grenze der Süßwasser- und Meeresarten liegt. Die plasmolytische Grenze der für *Mastigocladus* in einem neutralen Medium wie Glucose 0.5 Mol beträgt, entspricht bei 20°C einem Druck von 14.5 Atmosphären (nach der Tabelle aus Blum 1958) der sich dem osmotischen Druck bei Bakterien (über 20 Atmosphären, nach Rothstein 1959) nähert.

C. ZELLB AU

1. ZENTROPLASMA

Was die viel umstrittene Struktur des Zentroplasmas [»corps central« von Guilliermond (1933), »Kernäquivalent« von Herbst (1954), »Zentralsubstanz« von Zastrow (1953), »Chromatinapparat« von Fuhs (1958)] anbelangt, zeigt *Mastigocladus* nach Färbung mit basischen Farbstoffen dieselbe Form, welche schon 1929 Poljansky und Petruschewsky für verschiedene *Cyanophyceen* abgebildet haben, nämlich eine feine netzartig verflochtene stäbchen- oder fadenförmige, teilweise granulaartig verdickte Struktur. In tonnenförmigen Zellen ist diese Struktur mehr oder weniger strahlenförmig ausgebildet, in langgestreckten Zellen dagegen in der Richtung der Längsachse der Zelle verlängert. Die Feulgen'sche Reaktion fiel nur unter optimalen Bedingungen positiv aus und auch da nur so schwach, dass eine genauere Beobachtung erst mit einem Grünfilter möglich war. Viel deutlichere Bilder wurden durch Giemsa-Färbung (Abb. 10, Taf. III), Azur A — Thionilchlorid (nach De Lamater 1951), Gallocyaninchromalaun (nach Einarson 1949, cit. nach Cowden 1957) und besonders schöne Bilder durch eisernes Coelestinblau (Abb. 9, Taf. III) erzielt. Volutin-

körner waren mit Azur A metachromatisch rot gefärbt, Strukturen des Zentroplasmas dagegen blau. In älteren Fäden konnte im Gegensatz mit den Angaben von Z a s t r o w (1953), aber in Übereinstimmung mit den Resultaten von P r á t (1925) mit basischen Farbstoffen nur eine schwache oder überhaupt keine Färbung erzielt werden. Die vorangehende Hydrolyse mit nHCl bei 60°C zeigte bei der Färbung mit der Giemsa-Lösung keinen Vorteil, mit Ausnahme der Volutin- und Cyanophycinextraktion, da mit verdünnter Giemsa-lösung ohne HCl Hydrolyse eine noch bessere Färbung des Zentroplasmas erzielt werden konnte. Da in den Terminalzellen der Fäden oft keine Volutinkörner vorkamen, waren diese für die Untersuchung vorzuziehen. Nur der Alterzustand des Materials, Nährlösungszusammensetzung und status der Alge (im Sinne J a a g s 1945) scheinen für die Färbung des Zentroplasmas ausschlaggebend zu sein. So zeigte z. B. der status *microcystoides*, auch ohne Hydrolyse, nur eine Zentroplasma- aber keine Chromatoplasmafärbung. Eine bemerkbare Erhöhung der Basophilie des Zentroplasmas war immer in Hormogonien und jungen Fäden bemerkbar. Eine verschiedene Färbbarkeit der Kernäquivalente in Zusammenhang mit dem Alter und dem Nährstoffgehalt des Kulturmediums konnte D u g u i d (nach W i l k i n s o n und D u g u i d 1960) bei Bakterien beobachten.

Nach Einwirkung von heisser Trichloressigsäure oder Perchlorsäure, kann das Zentroplasma mit basischen Farbstoffen nicht mehr dargestellt werden. Diese Tatsache spricht ebenfalls für einen DNS-Gehalt des Zentroplasmas (siehe auch C a s s e l und H u t c h i n s o n 1954, und D r e w s und N i k l o w i t z 1956b). In vitalem Zustand kann der Chromatinapparat im Anoptralkontrast beobachtet werden, besonders wenn die Zellen in Albumin eingebettet sind (siehe S. 58 und Abb. 7. und 8. Taf. III). Ebenso kann man ihn vital gefärbt mit Fluorochromen im Fluoreszenzmikroskop darstellen. Von den verwendeten Fluorochromen ergaben die besten Resultate Auramin und Berberinsulfat, verdünnt im Leitungswasser oder in destilliertem Wasser, mit Phosphatpuffern des basischen Bereiches.

Im Elektronenmikroskop kann das Zentroplasma mit der üblichen Osmiumtetroxyd-Fixierung mit nur wenig Einzelheiten dargestellt werden. Es ist durch Abwesenheit der Chromatoplaslamellen charakterisiert und erscheint als ein unscharf begrenzter elektronenoptisch »leerer Raum«, der mit kettenartig verbundenen Fibrillen erfüllt ist (Abb. 29. Taf. V). In dieser Hinsicht kann es mit den Kernäquivalenten bei Bakterien verglichen werden (Siehe z. B. bei K e l l e n b e r g e r, R y t e r und S é c h a u d 1958). Nur nach lange andauernder Osmiumfixation ohne Puffer, konnte das Zentroplasma schärfer umgrenzt dargestellt werden (Abb. 31, Taf. V).

2. CHROMATOPLASMA (BAU UND TROCKENGEWICHT)

Schon die früheren Forscher der Cyanophyceenzelle hatten ein gefärbtes Chromatoplasma von einem nichtpigmentierten Zentroplasma unterschieden (B a u m g ä r t e l 1920). Erst mit der Einführung des Ele-

ktronenmikroskops konnte die feinere Struktur des Chromatoplasmas untersucht werden. D r e w s und N i k l o w i t z (1956a) haben als erste auf den charakteristischen lamellaren Bau des Chromatoplasmas bei *Cyanophyceen* aufmerksam gemacht. Später sind diese Befunde bei verschiedenen *Cyanophyceen* bestätigt worden (siehe die an S. 68. zitierte Literatur).

G e i t l e r (1958) fand bei *Chroococcus turgidus* unter besonderen physiologischen Bedingungen einen vergrößerten Lamellenbau, der im Lichtmikroskop sichtbar war. Unter speziellen Bedingungen (gehemmtes Wachstum, Gelbfärbung der Zellen) wurden solche grobe Lamellen auch bei *Mastigocladus* im Lichtmikroskop sichtbar (Abb. 23, Taf. IV). Bei Untersuchung der Zellen im polarisierten Licht kamen sie besonders zum Vorschein.

Im Elektronenmikroskop zeigen auch die normalen Zellen im Bereich des Chromatoplasmas einen Lamellenbau (Abb. 29, Taf. V). Die Lamellen sind nach der Osmiumfixierung zweischichtig und teilweise verdickt. Die Lamellendicke beträgt ca. 300 Å und der Zwischenlamellenraum bis 1000 Å. Bei Hormogonien, wo ein sehr kompakter Chromatoplasma vorliegt, ist der Lamellenbau etwas verwischt. An die Lamellen sind kleine undurchstrahlbare Körnchen gebunden, die besonders in der Nähe der Membran oft vorkommen und deren Natur noch unbekannt ist.

Mit der Methode nach B a r e r (1953) kann das Trockengewicht (die Trockensubstanz) der einzelnen Zellen berechnet werden. Die Bestimmung wurde mit gereinigtem Rindalbumin* und dem Anoptralkontrastverfahren durchgeführt. Wie B a r e r vermutet, kann das Albumin nach dem Tode der Zellen in diese permeieren, was eine Schwierigkeit für die Bestimmung der richtigen Konzentration des Albumins darstellt, besonders in Hormogonien und Terminalzellen der Fäden, die ein grösseres Permeabilitätsvermögen zeigen. Der Brechungsindex, bei welchem das Chromatoplasma der Zellen dem des Albumins entspricht, beträgt bei *Mastigocladus*-zellen 1,390—1,402, was berechnet auf Eiweiss einem Trockengewicht von 31,6—38,3% entspricht. Der Wert lag etwas höher bei den Hormogonien und Terminalzellen der Fäden und niedriger bei alten Fäden. So hohe Werte des Trockengewichtes nähern sich jenen der Bakterien (Trockengewicht berechnet von B a r e r auf 20—40%, und ist wahrscheinlich einer der Gründe für die hohe Resistenz der Alge gegenüber äusseren Faktoren.

Die Einbettung in Albumin bietet noch einen Vorteil für die Untersuchung dieser Alge, weil im Anoptralkontrast die Bildung von hellen Lichthof um die Zellen vermieden (F r e y - W y s s l i n g 1952) und so eine bessere Einsicht in das Innere der Zelle ermöglicht wird. Das Zentroplasma kann demnach nicht als ein optisches Artefakt gedeutet werden, wie das F u h s (1958) glaubt. Die Albuminlösung wirkt in weniger konzentrierten Lösungen nicht schädlich auf die Zellen, da z. B. *Phormidium uncinatum* darin rege Bewegungen zeigt. Nach ein paar

* Für die Überlassung vom Rindalbumin danke ich bestens Herrn Dr. Ing. Z. Pucar.

Tagen entstehen in albumineingebetteten *Mastigocladuszellen* sphäritähnliche Bildungen. Im Lichtmikroskop erschienen sie als gelbe Tröpfchen und im polarisiertem Licht zeigten sie eine positive Doppelbrechung in Bezug auf den Radius. Sie erinnern an die Sphärolithe die *W e b e r* (1939) bei *Tolypothrix*- und *Oscillatoria*-Fäden durch Einwirkung von Na-Oleat erhielt.

3. ZELLEINSCHLÜSSE

In der Cyanophyceenzelle kann man verschiedene körnige Einschlüsse in variabler Zahl und Grösse beobachten. Die Mehrzahl der Autoren hat zweierlei Zelleinschlüsse, die sich cytochemisch und morphologisch ungleich verhalten, unterschieden: die Cyanophycin- und die Volutinkörner. Während die Cyanophycinkörner nur bei *Cyanophyceen* vorkommen, konnten die Volutinkörner aus Cyanophyceen mit denen aus anderen Protisten wie Bakterien, Hefen und anderen Algen identifiziert werden (*Meyer* 1904).

a) Volutin

α) Nachweis und Morphologie

Das Volutin wird durch seine hohe Basophilie, metachromatische Färbung mit manchen basischen Farbstoffen, Löslichkeit in verdünnten Säuren und heissem Wasser, starke Elektronenstreuung im Elektronenmikroskop und Sublimation bei starkem Elektronenbeschuss (*Drews* 1958) gekennzeichnet (Abb. 30, Taf. V). Den Volutinkörnern wird auch ein Nucleinsäuregehalt zugeschrieben (*Wiame* 1958), der nicht sicher bewiesen worden ist. Die Anwesenheit von Nucleinsäuren ist schwer zu prüfen, weil die Polyphosphaten ähnliche und oft viel stärkere Reaktionen als die Nucleinsäuren selbst geben.

In lebenden Zellen ohne Färbung ist das Volutin nicht leicht erkenntlich. Doch konnte es in besonderen Fällen in lebenden *Mastigocladuszellen* im Lichtmikroskop wahrgenommen und photographisch dargestellt werden (Abb. 18, Taf. III). In diesem Falle hat das Volutin die Form von runden Körperchen, deren Brechungsexponent nur etwas höher von dem des umgebenden Plasmas liegt.

Dass Volutin und Cyanophycin nicht identisch sind, wie z. B. *Fischer* (1905) behauptet, ist aus den Abb. 14, 15 und 16, Taf. III der vorliegenden Arbeit ersichtlich. Die Fäden waren erst mit Chabaud-Flüssigkeit fixiert, dann mit Carminessigsäure gefärbt. Das Cyanophycin färbte sich dunkel bläulich-rot. An demselben Faden wurde nachher die *Meyer'sche* Reaktion ausgeführt, worauf sich auch die Volutinkörner, deren Lage, Form und Grösse mit Cyanophycinkörnchen nicht übereinstimmen, färbten. Der Brechungsexponent des Volutins variiert etwas von einem Körperchen zum anderen.

Der Inhalt der grossen Volutinkörner erscheint in der lebenden Zelle (Hellfeld und Anopralkontrast) wie in den elektronenmikroskopischen Bildern homogen. Nach Färbung mit basischen Farbstoffen, z.B. Methylen-

blau oder Giemsa-Lösung (Abb. 12, Taf. III), kommt es oft zur Bildung der sogenannten »Ringfiguren« (unterer Faden Abb. 12) indem der periphere Teil des Volutinkörperchens dunkel gefärbt, während der innere Teil nicht oder nur schwach gefärbt wird. Nach Einwirkung von eisernem Coelestinblau (bereitet nach Pickle und Gray) auf die lebende Zelle, kommt es zur Quellung des Protoplasten und die grossen dunkelvioletten bis schwarzen Volutinkörner treten nach einiger Zeit aus der Zelle heraus (Abb. 17, Taf. III). Das intensiv gefärbte Volutinkörnchen quillt weiter und platzt, wobei der flüssige ungefärbte oder schwach gefärbte Inhalt herausfliesst. Dieser Vorgang kann als eine teilweise Defektplasmoptyse (Küster 1958) unter der Einwirkung der Schwefelsäure des Reagens gedeutet werden. Nach Fixierung und Färbung der Zellen konnten auch die vorher in lebenden Zellen unsichtbaren kleinen Volutinkörnchen sichtbar gemacht werden. Nach Bleifärbung nach Ebel und Colas (1954 zit. nach Fuhs 1958) erscheint das Volutin in Form von schwarzen Körnern. Alle untersuchten basischen Farbstoffe färben das Volutin intensiv (Abb. 11, 12, 13, 19, Taf. III) (die Struktur des Zentroplasmas wird immer schwächer gefärbt). Toluidinblau und Azur I färben bekanntlich das Volutin metachromatisch. Vital können die Volutinkörner mit Fluorochromen und Diachromen gefärbt werden. Nilblau färbt schon bei pH 6,3, Methylenblau nur in basischem Bereich.

β) Bildung des Volutins in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen

Prát (1920) war der erste, der den Zusammenhang zwischen der Existenz der Volutinkörner und dem Phosphatangebot experimentell bewiesen hatte. Auch bei *Mastigocladus* kann man unter experimentellen Bedingungen eine erhöhte Bildung von Volutin erhalten. Das konnte auf zwei verschiedene Weisen erreicht werden: 1) durch Erhöhung des Phosphatangebotes und 2) durch niedrige Temperatur mit (0,01—0,1%) oder selbst ohne Phosphatzusatz. In beiden Fällen wurden als Phosphatquellen Na_3PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ verwendet. Am schnellsten geht der Vorgang vor sich, wenn man beide Verfahren kombiniert also die Alge bei niedrigen Temperaturen (1—10° C, auch bei Zimmertemperatur: 20° C) und Phosphatanwesenheit kultiviert. Aber auch ohne Phosphatangebot geht bei niedriger Temperatur die Volutinbildung ziemlich rasch vor sich, obschon etwas langsamer als bei Phosphatangebot. Das Material mit ganz kleinen oder lichtmikroskopisch unsichtbaren Volutinkörnern in einer phosphathaltigen Nährlösung bei 8° C war in Verlauf von 48 Stunden mit Volutinkörnern vollgestopft (Abb. 19, Taf. III). Besonders aktiv sind in dieser Beziehung die Terminalzellen der Verzweigungen und die Hormogonien, die sich als erste mit Volutin vollstopfen. Bei optimalen Temperaturen (48—52° C) war bei Phosphatzusatz die Anhäufung der Volutin granula langsamer als bei niedrigen Temperaturen. Ohne Phosphatangebot kam es bei 48—52° C zu keiner Anhäufung der Granula, und die Kultur ging zu Grunde.

Wenn die Kultur vorher mit Volutin angereichert war, wurden die Granula postmortal aus der Zelle gelöst. Die Bildung von Volutin in den Zellen geht vom Licht unabhängig vor sich.

In den Versuchen von Tischer (1957) ging *Anabaena* in Phosphatmangelkultur viel früher zu Grunde als *Oscillatoria*. Ähnliche Ergebnisse erhielt Prát (1925) bei *Nostoc*. Da *Mastigocladus* ebenso wie *Anabaena* und *Nostoc* in stickstofffreien Kulturmedien gedeihen können ist es möglich dass es sich um analoge Erscheinungen handelt.

Fügt man jedoch der Nährlösung ohne Phosphat 1%ige Erdabkochung hinzu, so wächst die Alge wieder, obwohl etwas langsamer als im Kontrollversuch. In solchen Lösungen (ohne P aber mit Erddekot) kommt es zu einer langsamen Verminderung der Volutinkörner, aber zu einer gleichzeitigen Vermehrung und Vergrößerung der Cyanophycinkörner. Die Dimensionen der Zellen werden dabei auf das mehrfache vergrößert, die Fäden werden tonnenförmig und zerfallen in einzelne kugelige Zellen. Obwohl das Wachstum, also auch die Eiweissynthese weiter gehen, scheint die Zellteilung inhibiert zu sein.

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Intensität der Färbbarkeit der Zentroplasmastruktur und der Volutinbildung beobachtet werden. In jungen, intensiv sich teilenden Zellen (besonders in Terminalzellen und keimenden Hormogonien) wo ein distinkt färbbares Zentroplasma vorliegt, sind die Volutinkörner sehr klein oder fehlen ganz, während bei mit Volutin vollgestopften Zellen kein färbbares Zentroplasma nachzuweisen ist. Ob die Dynamik der Polyphosphate in den Zellen mit der Synthese der Nucleinsäuren verknüpft ist (wie Sall, Mudd und Tagaki 1958 annehmen) wurde bisher nicht bewiesen, wenn auch dies nicht unglaublich erscheint.

Bei allen durchgeführten Versuchen wurde das Volutin durch die Meyer'sche Reaktion (1904) nachgeprüft.

b) Cyanophycin

Im Chromatoplasma der Cyanophyceenzellen kann man im lebendigen Zustand runde oder mehr oder weniger polygonale Körner von verschiedener Zahl und Grösse mit hohem Brechungsindex finden (im formolfixierten Material, mit Immersionsverfahren gemessen, betrug der Brechungsindex $n = 1,61$). Während die Cyanophycinkörner bei manchen Oscillatorialen an den Querwänden charakteristisch gebunden sind, können sie in der Zelle von *Mastigocladus* von der Querwand unabhängig liegen.

Eine besondere Anhäufung der Granula konnte in älteren, gelblichen, stark beleuchteten Kulturen bemerkt werden. Bei Phosphatmangel konnte neben einer Volutinverarmung auch eine Cyanophycinanreicherung beobachtet werden. Nach dem Zelltod bleiben die Cyanophycinkörner als die letzten unveränderten Bestandteile des Zellinhaltes erhalten.

Sie werden besonders gut durch Formol mit CaCl_2 -Zusatz fixiert (Fixierung für Phospholipide nach Baker). Während sie nach der

Alkoholfixierung schrumpfen, werden sie nach Formol-CaCl₂-Behandlung lebensstreu erhalten. Diese Fixierungsart hat noch einen anderen Vorteil: sie macht die Cyanophycinkörner in verdünnter Salzsäure unlöslich. Das ermöglicht eine schnelle Färbung mit sauren Farbstoffen in saurem pH-Bereich, wo sie nach anderer Fixierung gelöst werden. Auch konnten so verschiedene kleine Körner, die ohne vorangehende Fixierung in Carminessigsäure lösbar waren, nach Formol-CaCl₂-Fixierung und nachfolgender Färbung in Carminessigsäure als Cyanophycinkörner identifiziert werden.

In polarisiertem Licht zeigen die Cyanophycinkörner von *Mastigocladus* ein schwaches Aufleuchten. Die Anisotropie von Cyanophycin beschreibt als erster H e g l e r (1904 zit. nach F u h s 1958). D r e w s und N i k l o w i t z (1957) haben in den Zellen der von ihnen untersuchten Cyanophyceen im Elektronenmikroskop »strukturierte« Granula, die an der Querwand oder im Chromatoplasma verteilt vorkommen, nachgewiesen, identifizierten sie aber nicht mit den Cyanophycinkörnern. F u h s (1958c) konnte jedoch die Cyanophycinkörner bei *Oscillatoria amoena* im Elektronenmikroskop als »geschichtete Körner« identifizieren.

Die Kontrastierung und Identifizierung des Cyanophycins in elektronenmikroskopischen Bildern konnte bei *Mastigocladus* durch eine vorhergehende Carminessigsäurebehandlung erzielt werden (Abb. 32, 34, Taf. VI). Das Material wurde aus Kulturen mit Phosphatmangel genommen. Es enthielt kein lichtmikroskopisch nachweisbares Volutin (Kontrolle: Nachweis nach M e y e r), sondern reichlich Cyanophycin (Nachweis mit Carminessigsäure). Dasselbe Material zeigte ohne Carminessigsäurebehandlung (Abb. 33, Taf. VI) die Cyanophycinkörner beträchtlich weniger kontrastreich. Meistens enthielten sie keine auflösbare Struktur (wie in Abb. 33), manchmal war jedoch in den Cyanophycinkörnchen ein kontrastreicher Streifen, der durch die Mitte oder seitlich durch die Körnchen verlief (wie bei H o p w o o d und G l a u e r t 1960 abgebildet), vorhanden.

Von den Färbungen für lichtmikroskopische Zwecke ist jene mit Carminessigsäure noch immer eine der zuverlässigsten (Abb. 15, Taf. III). Man kann die Färbung beschleunigen, indem man das Material unter dem Deckglas in einem Tropfen Carminessigsäure etwas erwärmt. Dabei quellen die Cyanophycinkörner und werden so besser sichtbar. Von den anderen Farbstoffen färben das Cyanophycin in fixierten Zellen nur die sauren Farbstoffe u. zw. (die Formol-CaCl₂-Fixierung ausgenommen) erst nach einer Färbdauer von 24 Stunden. Man kann die Reaktion beschleunigen, wenn man die Farbe in einem sauren Puffer bereitet (z. B. pH 2). Rubin S (Säurefuchsin) hat sich als besonders geeignet erwiesen. Eosin, Kongorot, Benzopurpurin wurden ebenfalls mit Erfolg verwendet.

Mehrere Autoren (D r e w s 1955, D r e w s und N i k l o w i t z 1956, T i s c h e r 1957, D r a w e r t und M e t z n e r 1958, F u h s 1958) konnten bei den an die Querwände gebundenen Granula (nach F u h s Cyanophycinkörner) die für Mitochondrien charakteristischen Reaktionen

feststellen, welche auf das Auftreten von Redoxfermenten hinweisen. Bei *Mastigocladus* konnten keine Mitochondrienequivalente oder dergleichen gefunden werden, besonders nicht solche die an Cyanophycinkörner gebunden wären. Mit Sudan III färben sich die Cyanophycinkörner nicht. Mit Janusgrün und Visbagrün in verschiedener Konzentration und bei verschiedenen pH-Werten konnte ebenfalls keine Färbung der Cyanophycingranula erreicht werden (es färben sich dabei nur die Membran, das Zentroplasma und das Volutin, jedoch nur postmortal). Die Nadi-Reaktion fällt positiv aus in Form von blauen Tropfen (Abb. 22, 24, Taf. IV), die aber nicht an Cyanophycinkörner gebunden sind. Osmiumtetroxyd schwärzte die Cyanophycinkörner ebenfalls nicht in bemerkbarer Weise. Nur die Reaktion nach Baker fiel positiv aus (Abb. 21, Taf. IV), was auf Phospholipide hinweist. Es scheint, als ob die entlang der Querwänden bei anderen Cyanophyceen vorkommenden von den bei *Mastigocladus* im ganzen Protoplast zerstreuten Cyanophycinkörnchen zum mindesten funktionell verschieden sind.

4. MEMBRANBILDUNGEN (MORPHOLOGIE UND CHEMISMUS)

Unter dem Lichtmikroskop unterscheiden sich die Membranbildungen bei verschiedenen Stadien der Alge nicht wenig untereinander. Während ein junges Hormogonium ohne einer sichtbaren Membran zu sein scheint, sind die alten Fäden von einer dicken Membran umhüllt. Wenn man jedoch die Hormogonien unter dem Deckglas zerdrückt, so dass der Zellinhalt herausfließt, kann man auch hier, besonders nach Färbung mit basischen Farbstoffen, eine sehr dünne Zellhaut [= »Eigenmembran« Geitlers (1936), »inner investment« Fritschs (1905)] bemerken. Bei den älteren Fäden ist die Eigenmembran ebenfalls so dünn und die dicken Membranschichten stellen nur die Sekundärbildungen dar (= Zellscheide). Bei der Bearbeitung der Zellen nach der Methode von Kohl für »Plasmodesmen« (durchgeführt nach den Angaben bei Geitler 1932) schrumpft die Eigenmembran meist mit dem Protoplasten zusammen und wird von der Sekundärmembran abgetrennt (Abb. 20, Taf. III). Um die Eigenmembran werden sekundäre Membranbildungen ausgeschieden, die Zellscheide (»cell sheath« Fritschs 1905) die Fadenscheide und der extrazelluläre Schleim (Textfig. 1. f, h). Die Scheide kann die Trichome nur als ein Rohr umgeben. Bei eingeschnürten Trichomen umschließt sie jedoch die Zellen von allen Seiten (Textfig. 1.d). Die Eigenmembran ist in dieser Weise bei den meisten Zellen maskiert, aber man kann sie auch in diesen Fäden isoliert darstellen, indem man den Zellinhalt und die Scheide vollständig oder teilweise auflöst. Das geschieht am besten durch die Behandlung der Zellen mit Pepsin (Textfig. 1. a,b,d). Diese Tatsache ist im Widerspruch mit den Angaben von Metzner (1955), die nach der Bearbeitung der Zellen von verschiedenen *Cyanophyceen* im Pepsin keine Veränderung der Membranen fand. Bei *Mastigocladus* wurden durch Pepsin die Protoplasten teilweise abgebaut, wobei die sehr verdünnte Salzsäure der Pepsinlösung

eine Quellung (Textfig. 1.g) und eine teilweise Auflösung der Scheiden hervorrief, was aus Kontrollversuchen mit reiner verdünnter Salzsäure (ohne Pepsin) hervorging. Die Zellscheide der älteren Zellen und der Dauerzellen (Textfig. 1.i) wird durch Pepsin-HCl nicht angegriffen. Diese Methode war der früheren Methode von M ü h l d o r f (1938) mit 50%iger Schwefelsäure oder mit 30—50%iger Chromsäure vorzuziehen, da mit diesen starken Reagentien ein Schrumpfen des Materials zustande kommt und die Fäden zu einer schleimigen Masse zusammenfließen.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen war die Bearbeitung mit 30%iger Chromsäure nach Metzner (1955) für die Darstellung der Poren günstig. Nach 48-stündiger Bearbeitung der *Mastigocladus*-Fäden in Chromsäure, waren an den Querwänden feine Poren mit einem Durchmesser von etwa 110—180 Å (durchschnittlich ca 150 Å) sichtbar. (Abb. 27, 28, Taf. IV). An den Längswänden konnten dagegen keine Poren festgestellt werden. In einem Falle waren die Poren an der Querwand mit einer unbekannt Substanz ausgefüllt. Die Scheiden des in Osmium fixierten Materials zeigen im Elektronenmikroskop an Dünnschnitten eine fibrillare Struktur, die parallel zur Fadenrichtung liegt. Die Quer- und Längsmembranen (= Eigenmembranen) sind zweischichtig, was für andere Hormogonien bereits nachgewiesen wurde (Drews und Niklowitz 1956, Fuhs 1958, Hopwood und Glauert 1960). Diese Zweischichtigkeit ist bei *Mastigocladus* einwandfrei nur an elektronenmikroskopischen Bildern von mit Carminessigsäure behandelten Material zu erkennen (Abb. 32 und 34, Taf. VI). Im Lichtmikroskop ist diese Zweischichtigkeit jedenfalls nicht auflösbar. Deshalb kann eine einzelne Schicht der Eigenmembran nicht mit dem »inner investment« von Fritsch identifiziert werden, wie das Hopwood und Glauert (1960) tun. Ris und Singh (1961) finden die Membran der von ihnen untersuchten *Cyanophyceen* dreischichtig (»outer membran«, »inner investment« und »inner membran«).

Die freigelegten Eigenmembranen zeigen eine Rotfärbung mit ammoniakalischem Rutheniumrot und eine Blaufärbung mit verdünntem Methylenblau, was auf Pektinstoffe hinweist. Lässt man auf *Mastigocladus*-Trichome, die mit Pepsin vorherbehandelt waren (38° C, 3 Tage), bei 50° C 4 Stunden lang 5%iges Wasserstoffsuperoxyd einwirken, so kommt es zu einem teilweisen Zerfall der Eigenmembranen. Nach einer Verlängerung solcher H₂O₂-Behandlung auf 8—24 Stunden bleiben oft nur leere Scheiden übrig. Die Heterocysten bleiben dabei jedoch unverändert. In Cyanophyceenmembranen werden heute allgemein Pektinstoffe vermutet (Frey-Wyssling 1959). Trotz anscheinendem Pektin Gehalt zeigt die Eigenmembran, beobachtet im Wasser, eine schwache Doppelbrechung, die gemessen mit dem Sénarmontchen Kompensator 0,00075—0,001 beträgt. Die Indexellipse liegt in den Längswänden mit ihrer längeren Achse parallel zur Längsachse des Zellfadens von *Mastigocladus*, in den Querwänden dagegen normal zu dieser Richtung. Es leuchten nicht nur die Quermembranen wie Ullrich (1930) für *Oscillatoriamembranen* berichtet, sondern auch die

Längsmembranen, obwohl etwas schwächer. Die durch Chromsäure behandelten Fäden zeigen die gleiche Doppelbrechung wie die mit Pepsin-HCl bearbeiteten Fäden. Wenn das Wasser jedoch durch eine wässrige Kaliumquecksilberjodidlösung von $n = 1,56$ ersetzt wird, verschwindet die Doppelbrechung der Eigenmembran vollständig, kehrt aber nach Wasserzusatz wieder zurück. Nur die verdickten älteren sekundären Membranbildungen behalten ihre Doppelbrechung auch in der Lösung von Kaliumquecksilberjodid. Die Imbibition der Fäden im Canadabalsam kann wegen mehrerer Alkohol-Xylol-Reihen nicht direkt unter dem Mikroskop verfolgt werden. Wenn man die Membranen im Canadabalsam ($n = 1,54$) (das Auffinden von in Canadabalsam eingeschlossenen Fäden kann nur mit Hilfe von Anoptralkontrastoptik durchgeführt werden!) bei gekreuzten Polarisationsfiltern beobachtet, kann man auch kein Aufleuchten der Quer- und Längseigenmembranen bemerken, nur die nicht abgebauten sekundären Membranbildungen leuchten noch auf. Im Glycerin kann die Doppelbrechung der Eigenmembranen praktisch bereits nicht mehr bewiesen werden. Diese Gründe sprechen dafür, dass es sich um eine Formdoppelbrechung handelt.

Die sekundären Membranbildungen, welche aus dünnhäutigen schleimigen Fadenscheiden und dünneren oder dickeren Zellscheiden bestehen, unterscheiden sich im Chemismus und physikalischen Eigenschaften abhängig vom Alter der Fäden. Der grösste Teil der Scheidenbildungen (verdickte, feste Zellscheiden und Membranen der Dauerzellen ausgenommen), quillt und löst sich zum Teil in verdünnten Säuren. Kupferoxydammoniak greift die Scheiden nicht an. Mit Jod ergeben sie keine Färbung. In dieser Hinsicht entsprechen sie den Scheiden bei der Gattung *Lynobia* (siehe Metzner 1955). Die Doppelbrechung der Scheiden variiert von Faden zu Faden, manchmal auch von Zelle zu Zelle, und beträgt von 0,002 bis 0,004 (Abb. 26, Taf. IV). Das Vorzeichen der Doppelbrechung ist positiv in bezug auf die Längsachse der Fäden.

Durch Einwirkung von 5%igem H_2O_2 bei $50^\circ C$ (2 Stunden) werden die Scheiden nicht abgebaut; nach 48 Stunden kommt es jedoch zu einem Zerfall der Fäden. Nur die Heterocysten und die verdickten Scheidenreste bleiben erhalten. Die Scheiden werden nur nach Behandlung mit Eau de Javelle oder Chloralhydrat mit Rutheniumrot rot gefärbt. In den sekundären Membranbildungen kann es sich um hemicelluloseähnliche Stoffe handeln wie es aus der Löslichkeit in verdünnten Säuren zu schliessen ist. Die älteren, festen Scheidenteile und die Membran der Dauerzelle müssen aus einer unbekanntem, sehr resistenten Substanz gebildet sein.

Die Membranen der Heterocysten verhalten sich ganz verschieden von den Membranen der gewöhnlichen vegetativen Zellen. Sie zeigen eine blauviolette Färbung mit Jod nach vorhergehender 24 Stunden langen Behandlung mit 5%igem H_2O_2 bei 50° , bzw. Vorbehandlung mit Eau de Javelle oder Chloralhydrat. Die Färbung ist dichroitisch. Der dunkelste Farbton wird erreicht, wenn die Schwingungsebene des Polarisators parallel mit der Fadenachse liegt. Wenn die Substanz der Heterocyste Zellulose

wäre, wie Klein (1915) zu feststellen glaubte, so würden die Micelle der Zellulose in den Längsmembranen der Heterocyste parallel, in den Querwänden normal zur Fadenachse liegen.

Die Heterocysten zeigen im polarisierten Licht ein merkwürdiges Verhalten. Sie leuchten bei gekreuzten Polarisationsfiltern nicht gleichartig auf. Im Wasser eingebettet zeigt die Mehrzahl der dünnhäutigen, verlängerten Heterocysten bezüglich der Richtung der Fadenachse eine positive, die verdickten kurzen Heterocysten dagegen eine negative Doppelbrechung. Imbibiert in eine Reihe wässriger Lösungen von Kaliumquecksilberjodid mit verschiedenen Brechungsindices zeigt die Heterocystenmembran nach Osmiumsäurefixierung (nach anderen Fixierungsmitteln quillt sie im Kaliumquecksilberjodid) Änderungen des Doppelbrechungsvermögens. In Medien mit höheren Brechungsindices ($n = 1,482$ und mehr) haben alle Heterocysten ein negatives Vorzeichen der Doppelbrechung in bezug auf die Fadenachse. Dasselbe geschieht wenn die Fäden in Chlorzinkjod ($n = 1,490$) oder 30%iger Chromsäure ($n = 1,403$) liegen. In Medien mit noch höheren Brechungsindices wird die Doppelbrechung stärker, aber immer negativ. Diese Erscheinung lässt sich mit der Annahme, die Heterocysten bestehen nur aus Zellulose, schwer interpretieren.

D. HITZE-, KÄLTE- UND TROCKENRESISTENZ

Mastigocladus wurde Temperaturen von 60°, 70° und 75° C, eine halbe und eine Stunde lange ausgesetzt und darauf das Wachstum beobachtet. Die Alge konnte die Temperatur von 70° C noch gut ertragen, während nach dem Aussetzen der Temperatur von 75° C die Kulturen zu Grunde gingen. Da *Mastigocladus* aus Piešťany (Standorttemperatur 30 — 40° C — nach Prát und Kubin 1956) bei einer Temperatur von 60° C schon eine Pigmentdenaturation zeigt, wird es sich in diesem Falle vielleicht von physiologischen Rassen handeln wie Vouk (1936) vermutet hat oder das verschiedene Verhalten der Algen hängt mit der chemischen Zusammensetzung des Wassers zusammen.

Die Experimente von Prát, L'gotskij und Pospíšil (1950) weisen auch auf eine besonders grosse Kälteresistenz von *Mastigocladus* und anderen Thermalalgen. *Mastigocladus* aus der Thermalquelle Topusko konnte eine Temperatur von —5° C mehr als zwei Monate lang gut aushalten.

Auf die grosse Trockenresistenz von *Mastigocladus laminosus* hat Vouk (1922) hingewiesen. Eigene Untersuchungen zeigten, dass nicht alle Formen der Alge die gleiche Resistenz haben. Die Form, die aus Einzelzellen oder ganz kurzen hormogonienartigen Fäden bestand und als status *microcystoides* bezeichnet wurde, zeigte eine grössere Resistenz als normale Hormogonien und andere fädige Formen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Thermalalge *Mastigocladus laminosus* C o h n wurde lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei wurde folgendes festgestellt:

1. Das osmotische Verhalten der Alge liegt zwischen dem Verhalten der nichtthermalen Süßwasserarten und der Meeresarten der *Cyanophyceen* (plasmolytische Grenze bei 0,5 Mol Saccharose). Die Zellen von *Mastigocladus* sind für Saccharose und Glucose praktisch nicht nachweisbar permeabel.
2. Das Zentroplasma zeigt eine Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen, die vom Alter und physiologischen Zustand der Alge abhängt. Die Anwesenheit von DNS konnte nachgewiesen werden.
3. Das Chromatoplasma hat einen submikroskopischen lamellaren Bau, der unter besonderen Umständen auch lichtmikroskopisch sichtbar werden kann.
4. Das Trockengewicht des Chromatoplasmas, bestimmt nach der Methode von B a r e r, liegt zwischen 31,6—38,6% was sich dem Wert bei den Bakterien nähert.
5. In der Zelle konnten vor allem zwei Arten von Zelleinschlüssen untersucht werden: die Volutin- und die Cyanophycinkörner.
6. Die Bildung von Volutin und Cyanophycin konnte experimentell beeinflusst werden. Die Bildung von Volutin zeigt eine Abhängigkeit von dem Phosphatgehalt des Nährmediums und von der Temperatur, unter welcher die Kultur geführt wurde. Eine Anhäufung von Volutin konnte durch niedrige Temperaturen induziert werden (mit und auch ohne Phosphatzusatz), während bei optimaler Temperatur kein Volutin ohne Phosphatzusatz gebildet wird. Licht hat keinen Einfluss auf die Volutinbildung. Eine Cyanophycinanreicherung konnte in Phosphatmangelkulturen bei 48° C am Licht beobachtet werden.
7. Mitochondrienäquivalente, namentlich solche die an Cyanophycin gebunden wären, konnten nicht nachgewiesen werden.
8. Die Membranbildungen bestehen aus einer Eigenmembran, einer Zellscheide und einer Fadenscheide. Der Bau der Scheiden ist von den verschiedenen Entwicklungsstadien abhängig.
9. Die Querwände zeigen nach Chromsäurebehandlung, nach der Methode von Metzner, im Elektronenmikroskop Poren von 110—180 Å im Durchmesser.
10. Die Grenzwerte für Trockenresistenz und Temperaturreistenz liegen sehr hoch. Während sich *Mastigocladus laminosus* nach dem Bau der Zelle nicht wesentlich von nichtthermalen *Cyanophyceen* unterscheidet, zeigt er in physiologischem Sinne jenen gegenüber deutliche Unterschiede, indem er sich durch eine ausserordentliche Resistenz gegen verschiedene Faktoren (Dürre, Hitze, Kälte) auszeichnet.

VI. LITERATUR

- Baker, J.**, 1946: The Histochemical Recognition of Lipine. *Quart. J. Micro. Sci.* 87, 441.
- Barer, R.**, 1953: Determination of Dry Mass, Thickness, Solid and Water Concentration in Living Cells. *Nature* 172, 1097—1098.
- Baumgärtel, O.**, 1920: Das Problem der Cyanophyceenzelle. *Arch. f. Protistenkunde* 41, 50.
- Blum, G.**, 1958: Osmotischer Wert, Saugkraft, Turgor. In *Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung*, Bd. II, C 7a. Wien.
- Bringmann, G.**, 1950: Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oszillatorien. *Planta* 38, 541—563.
- Bringmann, G.**, 1952a: Die Organisation der Kernäquivalente der Spaltpflanzen unter Berücksichtigung elektronenoptischer Befunde. *Zbl. Bakter.* II 107, 40.
- Bringmann, G.**, 1952b: Über die Beziehungen der Kernäquivalente von Schizophyten zu den Mitochondrien höher organisierter Zellen, *Planta* 40, 398—406.
- Bütschli, O.**, 1890: Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen, Leipzig (nach Referat in *Bot. Zbl.*).
- Cassel, W. A. and Hutchinson, W. G.**, 1955: Nuclear Studies on the Smaller *Myxophyceae*. *Exper. Cell Res.* 6, 134—150.
- Copeland, J. J.**, 1936: Yellowstone Thermal *Myxophyceae*. *Ann. New York Acad. Sci.* 36, 1—232.
- Cowden, R.**, 1957: Methods for the Study of the Cytochemistry of Nucleic Acids and Chromosomes. *Mikroskopie* 12, 11—21.
- De Lamater, E.**, 1951: A Staining and Dehydrating Procedure for the Handling of Microorganisms. *Stain Technol.* 26, 199—204 (nach *Biol. Abstracts*).
- Devidé, Z. und Wrischer, M.**, 1960: Versuche über gasblasenfreie Plexiglas-Einbettung von pflanzlichen Objekten für Ultramikrotomie. *Mikroskopie* 14, 337—342.
- Drawert, H.**, 1949: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen, I. Literaturübersicht und Versuche mit *Oscillatoria borneti* Z u k a l. *Planta* 37, 161—209 (nach *Biol. Abstracts*).
- Drawert, H. und Metzner, I.**, 1958: Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Oscillatoria Borneti* Z u k a l. V. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. *Z. f. Bot.* 46, 16—25.
- Drawert, H. und Tischer, I.**, 1956: Über Redox-Vorgänge bei Cyanophyceen unter besonderer Berücksichtigung der Heterocysten. *Naturwissenschaften* 43, 132.
- Drews, G.**, 1955: Zur Frage der TTC-Reduktion durch Cyanophyceen. *Naturwissenschaften* 42, 646—647.
- Drews, G.**, 1958: Die granulären Einschlüsse der Mycobakterien *Arch. Mikrobiol.* 28, 369.
- Drews, G. und Niklowitz, W.**, 1956a: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, 1. Mitteilung. *Arch. Mikrobiol.* 24, 134—146.
- Drews, G. und Niklowitz, W.**, 1956b: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, 2. Mitteilung. *Arch. Mikrobiol.* 24, 147—162.
- Drews, G. und Niklowitz, W.**, 1957a: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, 3. Mitteilung. *Arch. Mikrobiol.* 25, 333—351.
- Drews, G. und Niklowitz, W.**, 1957b: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. IV. Mitteilung. *Arch. Mikrobiol.* 27, 150—165.

- Ebel, J. P., et Colas, J., 1954: Étude cytochimique des corpuscules métachromatiques des levures et des divers microorganismes. VIIIe Congr. int. de Bot. Paris (zitiert nach Fuhs 1958a).
- Einarson, L., 1951: On the Theory of Gallocyanin-chromalauin Staining. Acta Path. Scand. (Copenh.) 28, 82 (zitiert nach Cowden 1957).
- Elbers, P. F., Minnaert, K., and Thomas, J. B., 1957: Submicroscopic Structure of Some Chloroplasts. Acta bot. Neerlandica 6, 345—350.
- Fischer, A., 1905: Die Zelle der Cyanophyceen. Bot. Ztg. 51—129.
- Frémy, P., 1936: Remarque sur la morphologie et la biologie de l'*Hapalosiphon laminosus* Hansg. Ann. Protistol. 5, 175—200.
- Frey-Wyssling, A., 1952: Kontrasteffekt linsenartiger Objekte im Phasenmikroskop. Naturwissenschaften 40, 517.
- Frey-Wyssling, A., 1959: Die pflanzliche Zellwand, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Fritsch, F. E., 1905: Studies on *Cyanophyceae*, II. Structure of the Investment and Spore Development in Some *Cyanophyceae*. Beih. Bot. Zbl. 18, 194.
- Fritsch, F. E., 1945: The Structure and Reproduction of Algae, Vol. II., Cambridge University Press.
- Fuhs, G. W., 1958a: Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. Arch. Mikrobiol. 28, 270—302.
- Fuhs, G. W., 1958b: Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. Protoplasma 49, 523—540.
- Fuhs, G. W., 1958c: Über die Natur der Granula im Cytoplasma von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. Österr. Bot. Z. 104, 531—551.
- Geitler, L., 1932: *Cyanophyceae* in: Rabenhorsts Kryptogamen Flora, 2 Aufl. Leipzig.
- Geitler, L., 1936: Schizophyceen in: Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie Abt. II, Bd IV/1 Berlin.
- Geitler, L., 1958: Lamelläre Struktur des Chromatoplasmas von Cyanophyceen in mikroskopischen Dimensionen und Baueigentümlichkeiten des Protoplasten von *Chroococcus turgidus*. Arch. Mikrobiol. 29, 179—188.
- Glick, D., 1949: Techniques of Histo- and Cytochemistry, Interscience Publishers I. N. C. New York.
- Голлербах, М. М., Косинская, Е. К., и Полянский, В. И., 1953: Определитель пресноводных водорослей СССР, Выпуск 2, Москва.
- (Hollerbach, M. M., Kossinskaja, E. K. i Poljanskij, V. I. 1953: Opredelitel' presnovodnih vodoroslej SSSR, Vypusk 2, Moskva)
- Gomont, M., 1893: Monographie des Oscillariées. Ann. d. Sc. nat. bot. T. 15 et 16, ser. 7.
- Guilliermond, A., Mangenot, G. et Pantefol, L., 1933: Traité de cytologie végétale, Paris.
- Hegler, R., 1901: Unt. über die Organisation d. Phykochromaceenzelle, Jahrb. f. wiss. B. 36, 229—354 (zit. nach Metzner 1955).
- Herbst, F., 1954: Über die Kernäquivalente von *Aphanothece caldariorum* und *Pseudanabaena catenata* Lauterb. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 183.
- Hopwood, D. A. and Glauert, A. M., 1960: The Fine Structure of the Nuclear Material of a Blue-green Alga *Anabaena cylindrica* Lemm. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 8, 813—823.
- Jaag, O., 1945: Untersuchungen über die Vegetation und die Biologie der Algen des nackten Gesteines in den Alpen, im Jura und im Schweizerischen Mittelland. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, B. IX.
- Kellenberger, E. R., Ryter, A., and Séchaud, J., 1958: Electron Microscope Study of DNA containing Plasms. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 4, 671—678.

- Klein, G.*, 1915: Zur Chemie der Zellhaut der Cyanophyceen. Sitzungsber. Wien. Akad. 124 B, 529.
- Kohl, F. G.*, 1903: Ueber die Organisation und Physiologie der Cyanophyceenzelle und die mitotische Theilung ihres Kernes (nach Referat im Bot. Zbl.).
- Krieg, H.*, 1954: Nachweis von Kernäquivalenten an Cyanophyceen. *Experientia* (Basel) 10, 204.
- Küster, E.*, 1958: Plasmoptyse, in *Protoplasmatologia*, Handbuch der Protoplasmaforschung, B. II. C 7b, Wien.
- Lefort, M.*, 1960: Structure inframicroscopique du chromatoplasma de quelques Cyanophycées. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 250, 1525—1527.
- Lefort, M.*, 1960: Nouvelle recherches sur l'infrastructure du chromatoplasma des Cyanophycées. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 251, 3046—3048.
- Metzner, I.*, 1955: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. II. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. *Arch. Mikrobiol.* 22, 45—77.
- Meyer, A.*, 1904: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. *Bot. Ztg.* 62, 113—152.
- Mühdorf, A.*, 1938: Einige Betrachtungen zur Membranmorphologie der Blaualgen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 56, 316—336.
- Pernauer, S.*, 1958: Das Verhalten einiger Cyanophyceen bei osmotischen Impulsen. *Protoplasma*, 49, 269—295.
- Pickle, F. and Gray, P.*, 1957: A Simple Method of Staining Nuclei-like Bodies in Bacteria and Blue-green Algae with Celestine: Blue B-Iron. *Mikroskopie* 12, 27—32.
- Poljansky, G. and Petruschewsky, G.*, 1929: Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceen-Zelle. *Arch. Protistenkunde* 67, 11.
- Prát, S.*, 1920: K mikrochemii volutinovicch zrn Cyanophycei. *Rozpravy česke akad. ued a uměni* (Prag) 28, 1—10.
- Prát, S.*, 1925: Beitrag zur Kenntnis der Organisation der Cyanophyceen. *Arch. Protistenkunde* 52, 142—165.
- Prat, C., Лъготский Ст., Поспишил Ф.*, 1950: Устойчивость термальных синезеленых водорослей к низким температурам. *Bull. intern. Acad. tchèque Sci.* 20, 1—6.
- (Prat, S., L'gotckij, St., Pospisil, F.*, 1950: Ustojchivost' termal'nyh sinezelenyh vodoroslej k nizkim temperaturam.)
- Prat, C. и Кубин, Ш.*, 1956: Ассимиляция и дыхание термофильных синезеленых водорослей. *Физиология растений*, Том 3, вып. 6, 508—515.
- (Prát, S., i Kubin, Sh.*, 1956: Asimilatsija i dyhanie termofil'nyh sinezelenyh vodoroslej, *Fiziologija rastenij*, tom 3, vyp. 6, 508—515)
- Pringsheim, E. G.*, 1954: Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung, Jena.
- Ris, H. and Singh, R. N.*, 1961: Electron Microscope Studies on Blue-Green Algae. *J. Biophysic. and Biochem. Cytology* 9, 63—80.
- Родина, А. Т.*, 1956: Методы микробиологического исследования водоемов, *Жизнь пресных вод СССР*, часть I, Москва, Ленинград.
- (Rodina, A. T.*, 1956: Metody mikrobiologičeskogo isledovanija vodoemov, *Žizn' pressnyh vod SSSR*, chast' I, Moskva, Leningrad)
- Romeis, B.*, 1948: *Mikroskopische Technik*, München.
- Rothstein, A.*, 1959: Role of the Cell Membrane in the Metabolism of Inorganic Electrolytes by Microorganisms. *Bact. reviews* 23, 175.

- Sall, T., Mudd, S., Tagaki, A. 1958: Polyphosphate Accumulation and Utilization as Related to Synchronized Cell Division of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacter. 76, 640—645.
- Schinke und Ueda, K., 1957: A Cytomorphological and Cytochemical Study of Cyanophyta, I. An Electron Microscope Study of *Oscillatoria princeps*. Mem. Coll. Sc. Univers. Kyoto, Ser. B. 23, 101 (zit. nach Drawert und Metzner 1958).
- Schulz, G., 1955: Bewegungsstudien sowie elektronenmikroskopische Membranuntersuchungen an Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. 21, 335.
- Schwabe, G. H., 1944: Die umraumfremde Quellen. Mitt. d. dtsh. Ges. f. Nat. u. Völkerkunde Ostasiens, Suppl. XXI, Shangai.
- Spiekermann, R., 1957: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Protoplastiden. Protoplasma 48, 303—324.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Tischer, I., 1957: Untersuchungen über die granulären Einschlüsse und das Reduktions-Oxydations-Vermögen der Cyanophyceen, IV. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen, Arch. Mikrobiol. 27, 400—428.
- Tunmann, O., 1913: Pflanzenmikrochemie. Ein Hilfsmittel beim Studium pflanzlicher Objekte, Berlin.
- Ulrich, H., 1930: Über die Bewegungen der Beggiatoaceen und Oscillatoriaceen. II Mitt., Planta 9, 144—194.
- Vouk, V., 1922: Temperaturne granice termalne alge *Mastigocladus laminosus* Cohn. Spomenica 50-godišnjeg profesorskog rada S. M. Lozanica, Beograd.
- Vouk, V., 1936: Komparativno-biološke studije o termama. Rad JAZU knj. 256.
- Vouk, V., 1950: Grundriss zur einer Balneobiologie der Thermen, Basel.
- Weber, F., 1939: Zur Doppelbrechung des Cyanophyceen-Chromatoplasmas. Protoplasma 32, 142—144.
- Wiame, J. M., 1958: Accumulation de l'acide phosphorique (Phytine, Polyphosphates), in Ruhlands Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd IX, Der Stoffwechsel der schwefel- und phosphorhaltigen Verbindungen, 136—148, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Wilkinson, J. F. and Duguid, J. P., 1960: Cultural Conditions and Bacterial Cytology, Intern. Review of Cytology IX, New York and London.
- Zastrow, E. M., 1953: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. Arch. Mikrobiol. 19, 174—205.

VII. TAFELERKLÄRUNG

TAFEL I.

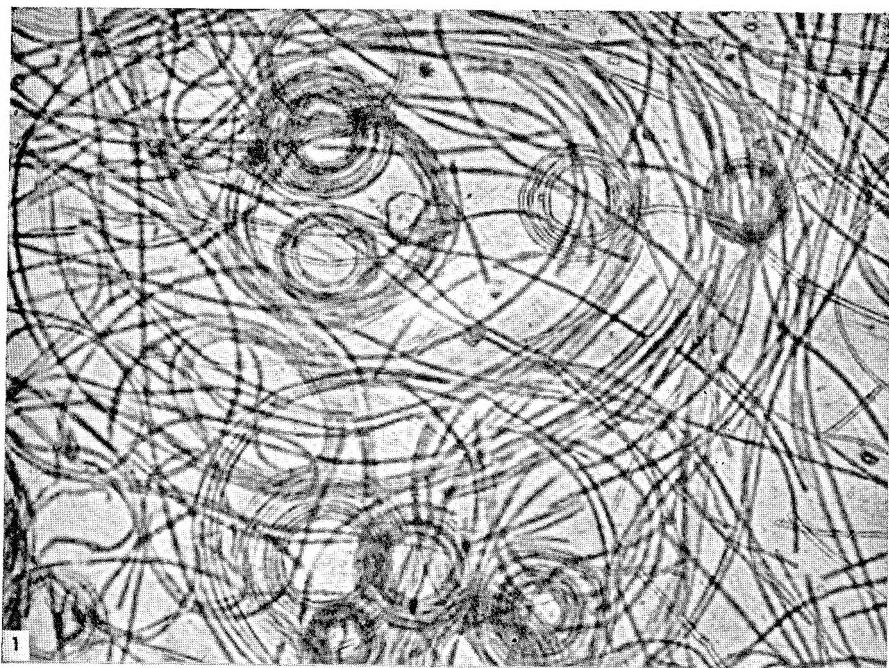
- Abb. 1. *Mastigocladus laminosus*, status *circinatus*, lebende Fäden, 225:1.
Abb. 2. Dasselbe, vergrössert, 400:1.

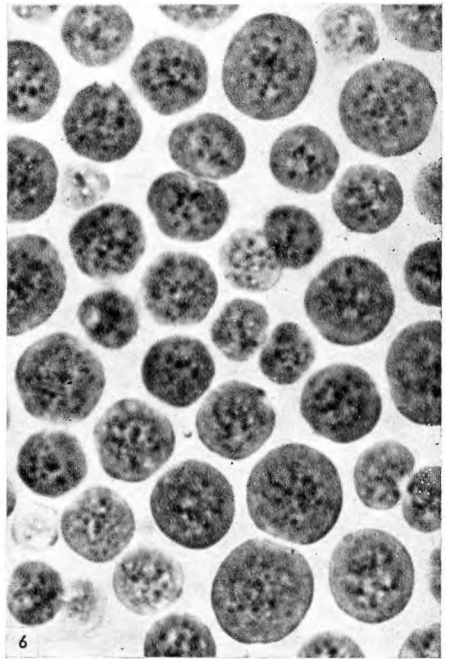
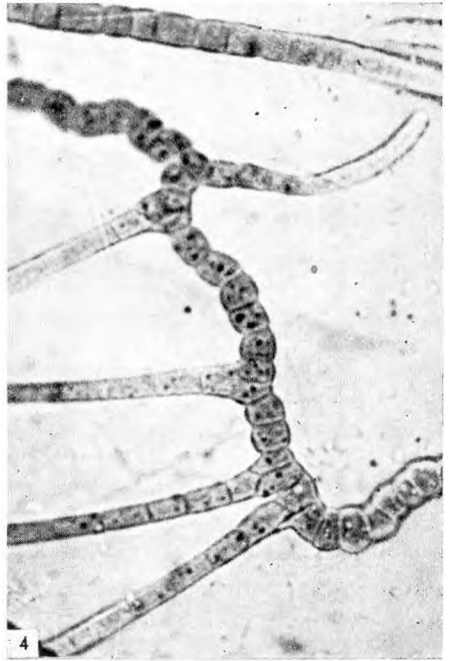
TAFEL II.

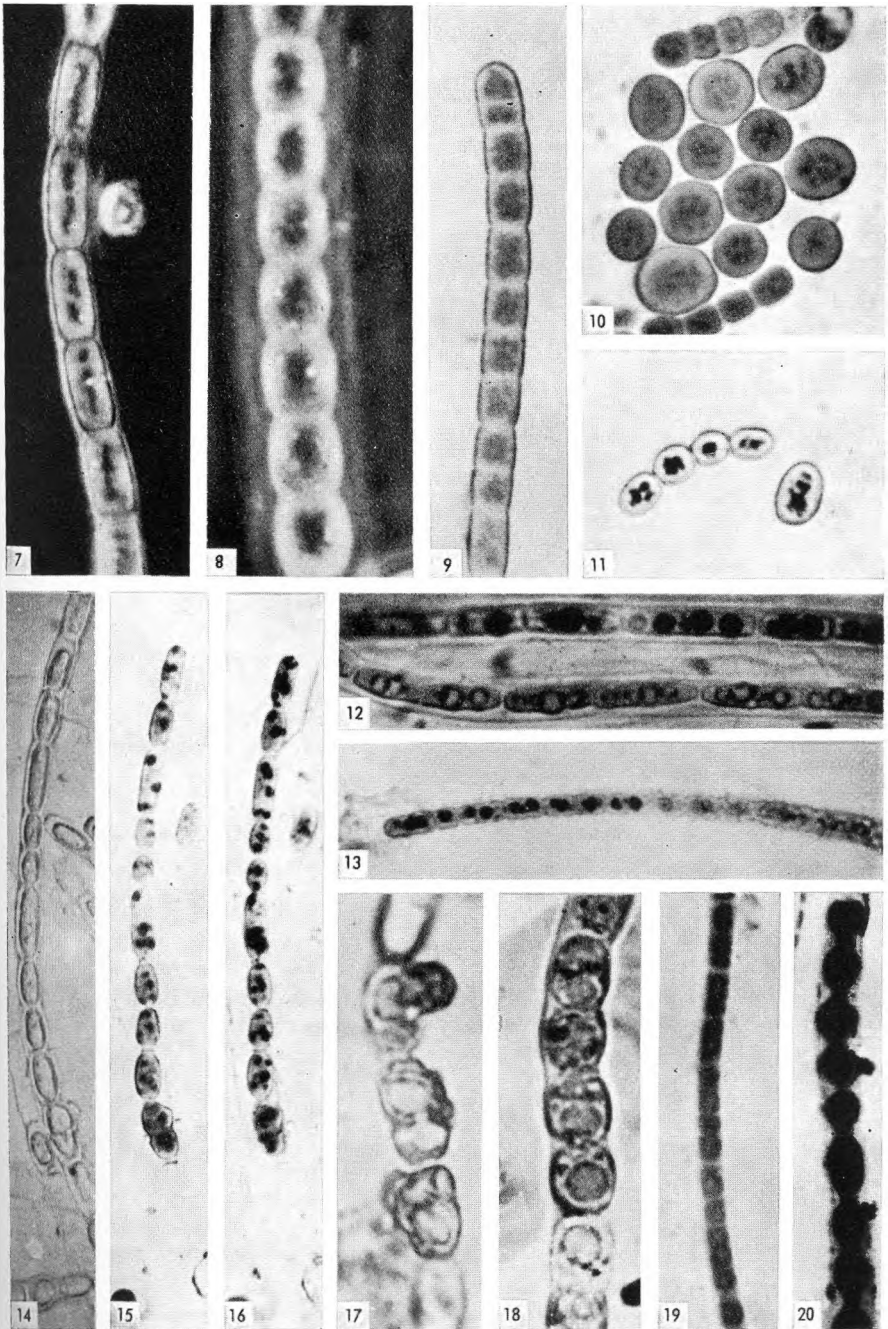
- Abb. 3. *Mastigocladus laminosus*, Teil eines Lagers mit typisch verzweigten Fäden, lebend, 370:1.
Abb. 4. Verzweigter Faden, lebend, 800:1.
Abb. 5. Teil eines Lagers aus konzentrierter Nährlösung, lebend; beachte die abnormal grossen, verschiedene Einschlüsse enthaltende Zellen, 600:1.
Abb. 6. *Mastigocladus laminosus*, status *microcystoides* 1700:1.

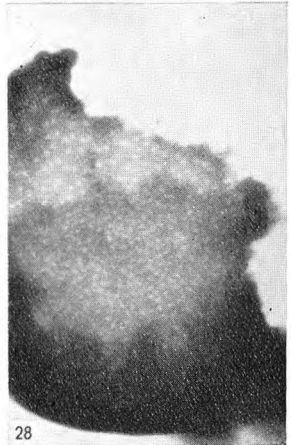
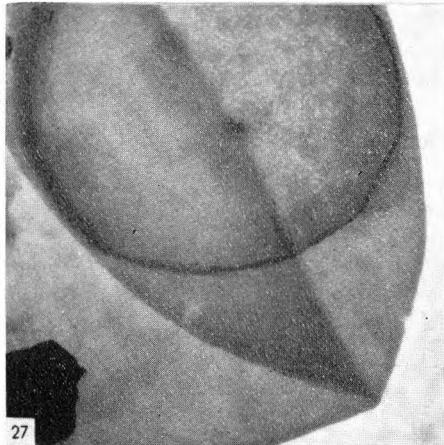
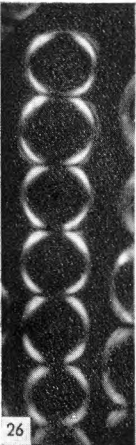
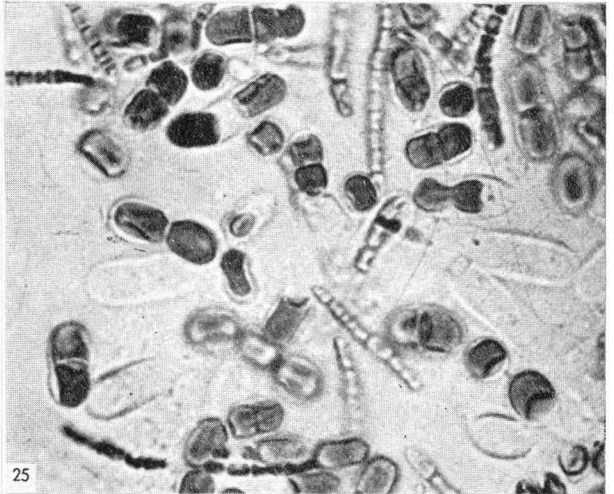
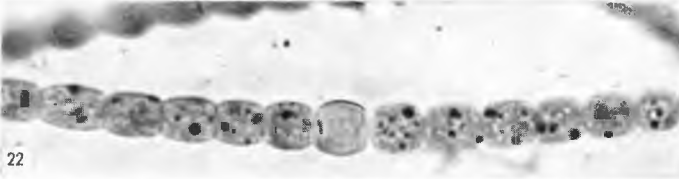
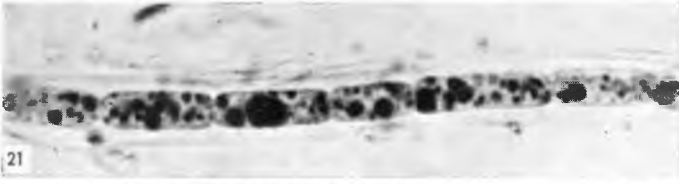
TAFEL III.

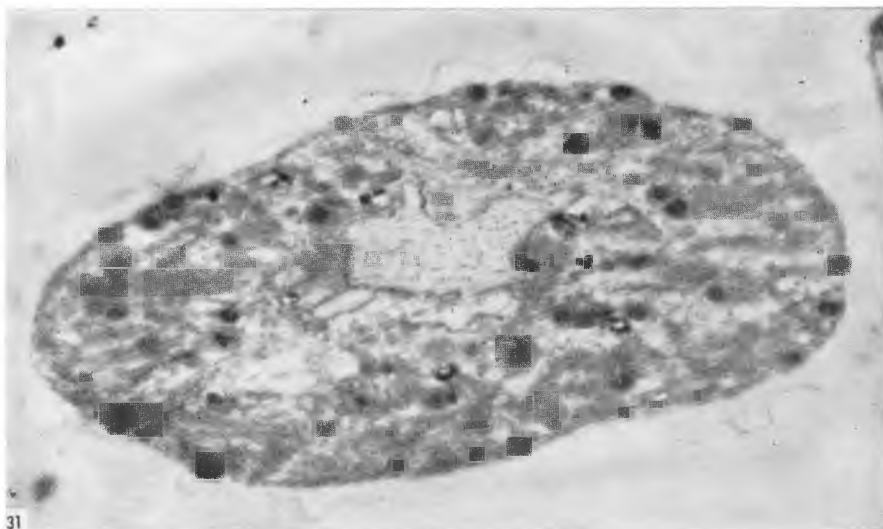
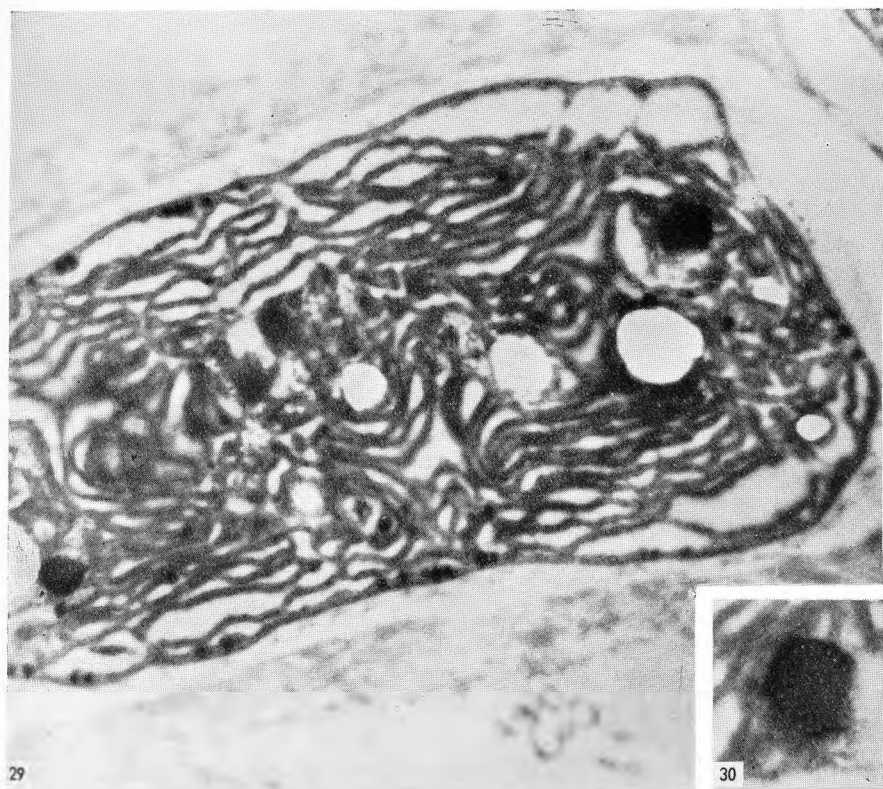
- Abb. 7. *Mastigocladus laminosus*, lebender Faden in Rindalbumin eingebettet, Anoptralkontrast, 1700:1.
Abb. 8. Lebender Faden in Rindalbumin eingebettet, Anoptralkontrast, 2550:1.
Abb. 9. Eisernes Coelestinblau, Zentroplasma gefärbt, 1700:1.
Abb. 10. Färbung nach Giemsa ohne Hydrolyse, Zentroplasma gefärbt, 1700:1.
Abb. 11. Reaktion nach Meyer, Volutin gefärbt, 1125:1.
Abb. 12. *Mastigocladus laminosus*, Färbung nach Giemsa, Volutinkörner gefärbt, 1500:1.
Abb. 13. Pyronin, Volutin gefärbt 1000:1.
Abb. 14. Fäden mit Chabaud-Gemisch fixiert, Cyanophycinkörnchen sichtbar 750:1.
Abb. 15. Derselbe Faden wie in Abb. 8. mit Carminessigsäure gefärbt, Cyanophycin dunkel, 750:1.
Abb. 16. Derselbe Faden wie in Abb. 8. und 9. mit Methylenblau + 1% H₂SO₄ (nach Meyer) gefärbt, Volutin dunkel, 750:1.
Abb. 17. Wirkung von eisernem Coelestinblau auf lebende, volutinhaltige Fäden: Volutinkörner quellen und fliessen aus der Zelle heraus, 2250:1.
Abb. 18. Lebender Faden mit grossen Volutinkörnern, 1920:1.
Abb. 19. Mit Volutin vollgestopfte Faden. Reaktion nach Meyer, 1000:1.
Abb. 20. Faden nach der Bearbeitung nach Kohl für »Plasmodesmen«, Protoplast mit Eigenmembran zusammengeschrumpft, 800:1.

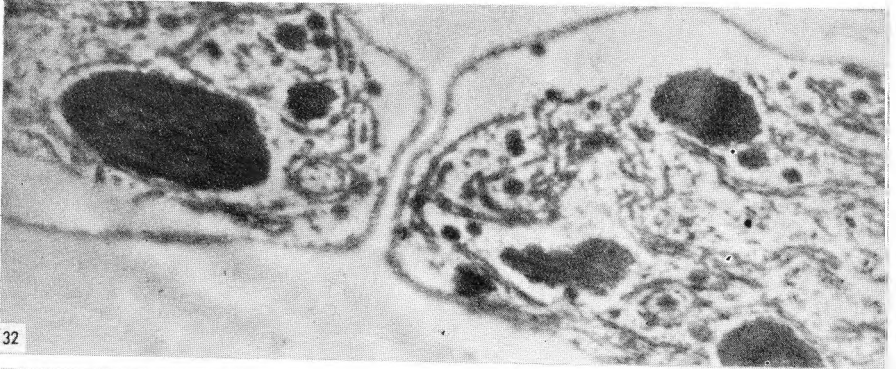




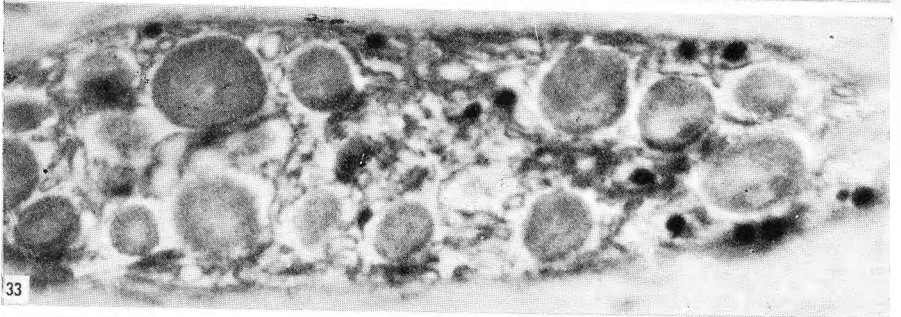




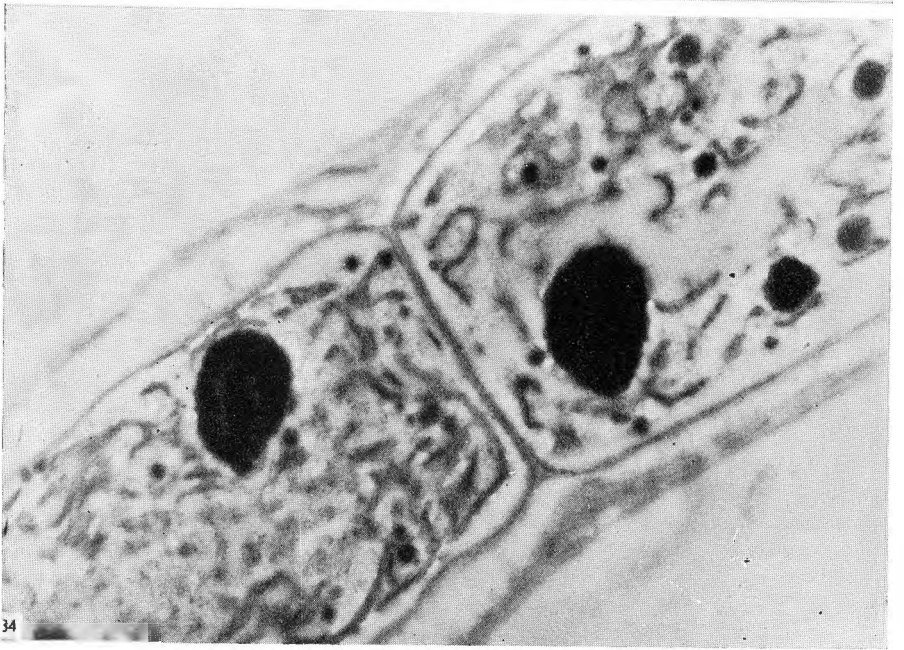




32



33



34

TAFEL IV.

- Abb. 21. *Mastigocladus laminosus*, Baker Reaktion, Cyanophycin gefärbt, 1350:1.
- Abb. 22. Nadi-Reaktion, 1350:1.
- Abb. 23. Lamelliertes Chromatoplasma lebend, Phasenkontrast, 2250:1.
- Abb. 24. Nadi-Reaktion, 1350:1.
- Abb. 25. Plasmolyse mit mol. NaCl, 800:1.
- Abb. 26. Sekundärmembranen von alten Fäden in polarisiertem Licht bei gekreuzten Polarisationsfiltern, 1600:1.
- Abb. 27. *Mastigocladus laminosus*, Poren in der Querwand. Chromsäurebehandlung nach Metzner, elektronenmikroskopische Aufnahme 31.500:1.
- Abb. 28. Eine andere Querwand mit derselben Methode bearbeitet 42.000:1.

TAFEL V.

- Abb. 29. *Mastigocladus laminosus*, lamelliertes Chromatoplasma, Osmiumfixierung, elektronenmikroskopische Aufnahme 21.000:1.
- Abb. 30. Volutinkörnchen mit zahlreichen Hohlräumen aus Abb. 1. vergrößert (teilweise Sublimation im Vakuum?) 42.000:1.
- Abb. 31. Osmiumfixierte Zelle, in der Mitte Zentroplasma, elektronenmikroskopische Aufnahme 26.250:1.

TAFEL VI.

- Abb. 32. *Mastigocladus laminosus*, Osmiumfixierung mit Carminessigsäurenachbehandlung, dunkle Granula-Cyanophycinkörner; Lamellen des Chromatoplasmas teilweise zerstört, Eigenmembran zweischichtig (Fäden einer Kultur mit Phosphatmangel, elektronenmikroskopische Aufnahme, 21.000:1.
- Abb. 33. Osmiumfixierung, helle Granula — Cyanophycin, (Fäden aus Phosphatmangelkultur), elektronenmikroskopische Aufnahme, 21.000:1.
- Abb. 34. Osmiumfixierung mit Carminessigsäurebehandlung, dunkle Granula — Cyanophycinkörner, Lamellen des Chromatoplasmas zerstört. 21.000:1.

S A D R Ź A J

ISTRAŽIVANJA TERMALNE ALGE *MASTIGOCLADUS LAMINOSUS* COHN SVJETLOSNI I ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

E. Marčenko

Modrozeleni alga *Mastigocladus laminosus* Cohn iz termalnog vrela Topusko (temperatura staništa 56°C) istraživana je pomoću svjetlosnog i elektronskog mikroskopa.

Po svojim osmotskim svojstvima *Mastigocladus* stoji na granici netermalnih i morskih cijanoficeja. Granica plazmolize mjerena u glukozi nalazi se kod 0,5 Mola. Stanica alge *Mastigocladus* je praktički nepermeabilna za glukozu i saharozu, a urea i glicerol permeiraju lako.

U protoplastu se može razlikovati kromatoplazma od centroplazme. Centroplazma pokazuje strukturu čija sposobnost bojenja bazičkim bojama i oblik ovise o starosti i fiziološkom stanju alge. Ona vjerojatno sadrži DNK.

Kromatoplazma pokazuje submikroskopsku lamelarnu građu, koja se kod posebnih fizioloških uvjeta može vidjeti i u svjetlosnom mikroskopu.

Sadržaj suhe tvari u kromatoplazmi leži između 31,6 — 38,3% proračunat prema metodi B a r e r-a. Ova izvanredno velika gustoća plazme približava *Mastigocladus* bakterijama. B a r e r-ova metoda omogućuje i promatranje centroplazme in vivo uklapanjem živih stanica u albumin i promatranjem u anopralkontrastu.

U stanici se nalazi više vrsti uklopina od kojih se mogu distinktno razlikovati volutinska i cijanoficinska zrnca. Pojačano stvaranje cijanoficina i volutina može se izazvati eksperimentalnim putem. Pojava volutina ovisi o dodatku fosforinih spojeva i temperaturi pri kojoj se alga uzgaja. Kod niskih temperatura zapažen je nagli porast ukupne količine volutina u stanicama. Povećanje ukupne količine cijanoficina zapaženo je u kulturama uzgojenim uz nedostatak fosforinih spojeva.

Mitohondrijima slični organeli nisu mogli biti nađeni, a pogotovo se cijanoficinskim zrcima kod mastigokladusa ne može pripisati slična funkcija.

Membranske tvorevine sastoje se od stanične membrane i sekundarnih tvorevina, tokova i sluzi, čija građa ovisi o starosti alge.

Poprečne membrane pokazuju nakon obrađivanja u kromnoj kiselini, metodom po M e t z n e r-ovoj, pore promjera 110 — 180 Å, kojih u uzdužnim membranama nema.

Granice rezistencije na sušu i temperaturu vrlo su visoke.

Građa stanice mastigokladusa ne razlikuje se bitno od građe netermalnih cijanoficeja, dok se u fiziološkom pogledu odlikuje neobično velikom otpornošću na različite vanjske faktore (hladnoću, vrućinu, sušu).