

EXPERIMENTELLE HERVORBRINGUNG MIKRONUCLEUS- LOSER CILIATEN.

VON JÁNOS HORVÁTH.

(Aus dem Ungar. Biologischen Forschungsinstitut Tihany a. Balaton.)

Mit 6 Abbildungen am Tafel I.

(Eingegangen am 10. 7. 1947.)

In alten Züchtungen haben bereits zahlreiche Forscher (so z. B. IVANIC 1934, PIEKARSKI 1939 usw.) mikronucleuslose Ciliaten gefunden, vermochten indessen nichts auszusagen über Ursache sowie Art und Weise des Zustandekommens der Mikronucleuslosigkeit. In Nachstehendem berichten wir über unsere Versuche zur experimentellen Herbeiführung des Mikronucleusverlustes auf zweierlei Wegen.

Als Versuchsobjekt diente uns die hypotriche Bodenciliate *Kahlia simplex* HORVÁTH (s. HORVÁTH 1934 u. 1936).

Das in unserem Versuche angewandte Züchtungsverfahren, das die erzielten Ergebnisse entscheidend beeinflusst, haben wir in einer früheren Arbeit eingehend beschrieben (1947), weshalb wir hier auf es lediglich hinweisen.

Wir erzeugten die mikronucleuslose *Kahlia* 1. durch Ultraviolettbestrahlung, 2. durch Einwirkung bakterieller Stoffwechselprodukte.

1. Die Erzeugung auf dem Wege der Ultraviolettbestrahlung ging wie folgt vor sich. In einer Boveri-Schale bestrahlten wir in 5 cm Nährboden eine grössere Menge Tiere 6 Minuten aus einer Entfernung von 35 cm mit der Heräusschen Jubiläums-Höhensonne 2, 5 A., 220 V. Die Temperatur stieg im Laufe der Bestrahlung durchschnittlich um 2° C. Wir hielten die Züchtung vor und nach der Bestrahlung im Thermostat bei 20° C. Für die Erzielung unseres Versuchszweckes war von sehr wesentlicher Wirkung der Züchtungs-, des näheren der Teilungszustand der Tiere, was von folgendem Versuche bestätigt wird. Wir bestrahlten nämlich zur gleichen Zeit und auf dieselbe Weise eine ältere Züchtung mit geringer Anzahl sich teilender Kahlies, sowie eine frische, an Teilungstieren reiche Züchtung. Bei der Prüfung des Kern-

zustandes mit Feulgen sowie Karmin-Essigsäure vor der Bestrahlung fanden wir, dass beide eine normale Kerngarnitur besitzen, lediglich die Kerngrösse der Tiere alter Züchtung war geringer als die der frischen Zucht. In jener befanden sich 2—3% der Ciliaten in Teilung oder teilungsbereitem Zustande, in dieser aber 50%. Bei der Untersuchung des Kernbestandes unmittelbar nach der Bestrahlung stellten wir fest, dass die Kahlien alter Zucht zu etwa 1% ihren Mikronucleus eingebüsst hatten, wogegen diese Zahl in der optimal sich teilenden neuen Züchtung 4—5% betrug. 24 Stunden nach erfolgter Bestrahlung untersuchten wir die Lage des Kernbestandes aufs neue und konstatierten, dass die Anzahl der mikronucleuslosen Tiere der alten Zucht auf 2—3% anwuchs, dagegen die der neuen Züchtung auf 50%. So wurde es denn offenbar, dass die Ausschaltung der Mikronuclei auf Ultraviolettbestrahlung hin in der Hauptsache bei in Kernteilung befindlichen Tieren erfolgt.

Beim Untersuchen der Details der Ultraviolettbestrahlung vom Gesichtspunkte des Zustandekommens des mikronucleuslosen Zustandes aus beobachteten wir folgendes. Unmittelbar nach der Bestrahlung verlangsamt sich im allgemeinen die Bewegung der Tiere, einzelne von ihnen kugeln sich ab. Eine Sterblichkeit kommt bei der erwähnten Bestrahlungszeit, — entfernung und — temperatur nicht vor. Beim Färben von in diesem Stadium befindlichen Kahlien vermochten wir lediglich festzustellen, dass der Mikronucleus in dem oben ermittelten prozentualen Verhältnis spurlos verschwindet. Dies lässt sich nur mit seinem Platzen und Vorteilen im Körperplasma erklären. Die Prozentzahl der auf diese Weise ausgerotteten Mikronuclei ist indessen so gering, dass man damit nicht zu dem nach 24 Stunden sich zeigenden hohen Prozentwert gelangt. Deshalb unterzogen wir 6, 8 und 12 Stunden nach der Bestrahlung den Kernbestand der Tiere einer wiederholten Untersuchung und damit zugleich den Zustand der Mikronuclei. Die Untersuchungsergebnisse sind in 2 Gruppen zu teilen: a) die Mikronuclei gestalten sich restlos zu Makronuclei um, b) die Mikronuclei werden von einer solch hochgradigen Läsion betroffen, dass sie stufenweise zugrunde gehen und im Körperplasma resorbiert werden.

a) Die völlige Umgestaltung der Mikro- zu Makronuclei bringt die mikronucleuslosen Tiere unmittelbar zustande. Dies veranschaulicht die Mikroaufnahme Abb. 1. Man sieht auf dem Bilde 3 Mikronuclei, die sich bereits in Makronuclei verwandelt haben, während ein vierter Mikronucleus kraft seiner Granulation und seines Ausmasses bereits gleichfalls als Mikronucleus zu betrachten ist, wogegen aber die dünne

Beschaffenheit seiner Körnung zugleich seine Lebensunfähigkeit bestätigt. Diese umgestalteten Mikronuclei, die schon als Makronuclei anzusehen sind, verschmelzen bei der nächsten Teilung in den ursprünglichen Makronucleus, und damit verschwindet endgültig der Mikronucleus.

b) Auch innerhalb der lädierten Mikronuclei sind Läsionsabstufungen feststellbar, im Endergebnis aber gehen sie über kurz oder lang zugrunde und werden in das Körperplasma resorbiert, d. h. der Mikronucleusverlust kommt unmittelbar zustande.

Die mildeste Läsionsform ist auf Abb. 2. zu sehen: man erblickt zwischen den beiden Polen des die Teilungsspindel bildenden Mikronucleus einen scharfen Gegensatz, indem der eine zugespitzt, aber andere erheblich stumpfer ist. Die Zugfäden kommen nicht zur Entwicklung. Die die nächste Abstufung darstellende Abb. 3 zeigt 3 wurstartig gestreckte Mikronuclei. Ihre chromatinen Substanzen sind innerhalb des Kernkörpers ungeordnet und ungleichmässig gelagert. Derartige Läsionen erlitten habende Mikronuclei gestalten sich an ihren beiden Enden hantelförmig zu Makronuclei um, vermögen aber nicht bedeutend zu wachsen. Sie lassen sich noch durch einige Sprösslinge hindurch in dieser Lage verfolgen, sodann verschwinden sie; vermutlich gehen sie zugrunde. Auf Mikroaufnahme Abb. 4. ist zu sehen, dass der mittlere Teil der auf Ultraviolettbestrahlung hin lädierten Mikronuclei vollständig zerstört ist. Die derart angegangenen Mikronuclei lassen sich im weiteren mit nur wenig Chromatinsubstanz auch noch 18—20 Stunden lang verfolgen. Späterhin verschwinden sie aus dem Körper. Den gleichen Effekt vermag hervorzubringen der Ultraviolettstrahl auch an den im Knäuelstadium befindlichen Mikronuclei wie dies von Abb. 5. veranschaulicht wird.

2. Zur zweiten Darstellungsmethode der mikronucleuslosen Kahlien veranlasste uns die Beobachtung, dass auch unter längere Zeit bei gemischter Bakteriennahrung gehaltenen Tieren normaler Kerngarnitur mikronucleuslose Tiere auftreten. Dies brachte uns auf die Idee, die auslösende Ursache in dem sich ansammelnden bakteriellen Stoffwechselprodukte zu suchen. Zu dessen Feststellung verfahren wir folgendermassen. Wir zentrifugierten mehrere 100 Tiere mittels Handzentrifuge ab und übertrugen sie in eine Boveri-Schale in 6 ccm sterile Nährlösung. Dieser setzten wir 0,5% Mannit zu und impften sie reichlich mit von uns isoliertem (des näheren noch nicht bestimmtem) *Azotobacter* sp. Als Kontrolle dienten auf die gleiche Weise, jedoch ohne Mannit und ohne *Azotobacter* vorbereitete Versuchsobjekte,

die die Nahrung aus den hineingefallenen sowie den mit den Tieren transportierten Bakterien empfangen. Eine Versuchsserie erledigten wir bei Zimmertemperatur, eine andere im Thermostat bei 34° C.

Bei Zimmertemperatur entwickelte sich in der Nährflüssigkeit am 4. Tage nach Versuchsbeginn eine reichliche *Azotobacter*masse, wogegen in der Kontrolle die Bakterienzahl nicht grösser wurde. Zeitweilig prüften wir den Zustand der Kerngarnitur der Kahlien und fanden, dass die mikronucleuslosen Tiere in der mit *Azotobacter* behandelten Züchtung am 5. Tage erschienen, was wir aber im Kontrollversuche nicht beobachteten. Die Kontrollciliaten encystierten sich endlich vollständig nach 12—14 Tage. In den bei 34° C durchgeführten Versuche traten die mikronucleuslosen Tiere im allgemeinen bereits am 4. Tage in den mit *Azotobacter* behandelten Züchtungen auf, wogegen die Kontrolltiere binnen 24—36 Stunden massenhaft konjugierten und Kurz nach der Konjugation sich encystierten. So erwies es sich denn, dass das konzentriert angewandte Bakteriumstoffwechselprodukt das Verschwinden des Mikronucleus zum Ergebnis hat.

Durch eine nähere Untersuchung gelang es auch festzustellen, dass das Verschwinden in Wirklichkeit eine Umgestaltung ist, indem nämlich der Mikro- zu einem Makronucleus wird. Eine solche Veränderung führen wir in A b b. 6. vor: in der Haupttasche der ursprünglichen Makronuclei, in der caudalen Region der Tiere, sieht man den einen Mikronucleus wie er sich zu einem Makronucleus verwandelt.

Läsionen von der Natur, wie sie von der oben besprochenen Ultraviolettbestrahlung im Mikronucleus hervorgebracht wurden, die also im Endergebnis zur restlosen Vernichtung des Mikronucleus führten, werden von Bakteriumstoffwechselprodukten nicht verursacht.

BESPRECHUNG.

Sieht man von den sonstigen zerstörenden Wirkungen des Ultraviolettstrahls auf den Mikronucleuskörper ab, so lässt sich die auf zweierlei Wegen erzielte Mikronucleuslosigkeit dadurch auf einen gemeinsamen Nenner bringen, dass der Mikronucleus auf die Wirkung eines gewissen Quantum von Ultraviolettstrahlen hin sich ebenso zu einem Makronucleus umgestaltet wie dies zufolge Wirkung einer bestimmten Menge der Stoffwechselprodukte des Bakteriums geschieht. Diese Feststellung legt auch den Gedanken nahe, dass die chemische Umwandlung irgendeines zellbildenden Stoffes oder Systems die Umgestaltung des Mikro- zum Makronucleus zum Ergebnis habe. Die auf

diese Weise ausgelöste Veränderung deckt sich im Endergebnis vollständig mit der in der Konjugation erfolgenden ähnlichen Umwandlung. Über den chemischen Prozess vermögen wir nur soviel zu sagen, dass er irreversibel sei, denn wir beobachteten niemals bei Einwirkung des Ultraviolettstrahls oder der Bakteriumstoffwechselprodukte, dass der Makro- zu einem Mikronucleus geworden wäre.

Bisher war das Auftreten des Mikronucleus in normal scheinenden Züchtungen ein Rätsel, so schrieb z. B. PIEKARSKI (1939), man könne über die Ursache des Mi-Verlustes nichts aussagen. Wir dagegen können auf den Ergebnissen unserer Versuche fussend erklären, dass die Anhäufung der Stoffwechselprodukte des Bakteriums als chemische Wirkung die Umgestaltung der Mikro- zu Makronuclei unter normal scheinenden Umständen herbeiführt.

ZUSAMMENFASSUNG.

Wir erzeugten in der hypotrichen Bodenciliate *Kahlia simplex* HORVÁH auf experimentellem Wege einen mikronucleuslosen Zustand. Die Herstellung beruht auf zweierlei Methoden: 1. Auf der Wirkung von Ultraviolettbestrahlung, 2. auf der von Bakteriumstoffwechselprodukten.

1. Auf die Wirkung von Ultraviolettstrahlen hin kamen unmittelbar und mittelbar mikronucleuslose Tiere zustande,

a) unmittelbar dadurch, dass der Mikronucleus zugrunde ging und in das Körperplasma resorbiert wurde,

b) mittelbar durch Umwandlung der Mikro- zu Makronuclei.

2. Auf die Wirkung von Bakteriumstoffwechselprodukten hin gestalteten sich die Mikro- zu Makronuclei um.

3. Ein entsprechendes Quantum der Ultrastrahlwirkung verwandelte den Mikro- zu einem Makronucleus gerade so wie ein bestimmtes Quantum der ein chemisches Agens repräsentierenden Bakteriumstoffwechselprodukte.

4. Die Ultraviolettstrahlwirkung auf den Mikronucleus kam am besten zur Geltung bei sich optimal vermehrenden Tieren, des näheren bei der in Teilung befindlichen oder kurz vor derselben stehenden *Kahlia*.

SCHRIFTTUM.

BELAR, K.: (1926). *Formwechsel der Protistenkerne*, Jena.

HORVÁTH, J.: (1934), *Acta Biol. (Szeged)*, 3, 60; (1936): *Arch. Protist.* 86, 482; *Arch. Biol. Hung.* 18. im Erscheinen.

IVANIC, M.: (1934). *Arch. Protist.* 83, 344. PIEKARSKI, G.: (1939). *Ebenda* 92, 117.

ABBILDUNGSTEXTE.

- Abb. 1. Aus Mikronucleus umgestalteter Makronucleus. Karmin-Essigsäurefärbung. Vergr.: 1200 x.
- Abb. 2. Auf Ultraviolettbestrahlung hin lädierter Mikronucleus: unregelmässige Spindelform, die Ziefäden entwickelten sich nicht. Karmin-Essigsäurefärbung. Vergr.: 610 x.
- Abb. 3. Auf Ultraviolettbestrahlung hin deformierte Mikronuclei: ungleichmässige Chromatinverteilung. Karmin-Essigsäurefärbung. Vergr.: 920 x.
- Abb. 4. u. 5. Auf Ultraviolettbestrahlung hin in der Mitte korrodierte Mikronuclei. Karmin-Essigsäurefärbung. Vergr.: 450 x. und 320 x.
- Abb. 6. Auf Wirkung von Bakteriumstoffwechselprodukt hin zu Makronucleus umgestalteter Mikronucleus in der caudalen Körperregion. Vergr.: 320 x.