

(Aus dem botanischen Institut der Universität Rostock.)

Über eine Hefeinfektion bei *Daphnia magna*.

Von

Werner Rühberg.

(Hierzu 17 Textfiguren und Tafel 3.)

1. Einleitung.

Im Zoologischen Institut der Universität Rostock wurde im Sommer 1928 in Daphnienkulturen eine schnell um sich greifende Krankheit beobachtet. Die erkrankten Daphnien fielen schon rein äußerlich durch ihre weißliche Färbung auf, und bei mikroskopischer Untersuchung zeigten sie sich erfüllt von einer erstaunlich großen Zahl hefeähnlicher Organismen.

Dankenswerterweise übermittelte Herr Prof. Dr. SCHULZE sein Material zur Begutachtung dem Botanischen Institut, wo die Hefenatur des Parasiten festgestellt wurde.

Da über parasitische Hefen bisher nur sehr wenig bekannt ist, schien es wünschenswert, diese Erkrankung einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. Die Arbeit wurde ausgeführt in den Jahren 1930—1932.

Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. v. GUTTENBERG meinen ergebensten Dank auszusprechen für die ständige Anregung und Förderung, die er mir zuteil werden ließ. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. BAUCH für seine Ratschläge und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte. Bei der Einarbeit in die Anatomie der Daphnien erfuhr ich wertvolle Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. SCHULZE, wofür ich ebenfalls meinen Dank zum Ausdruck bringen möchte.

2. Literatur.

Die Angaben, die sich in der Literatur über parasitierende Sproßpilze finden, sind nicht sehr umfangreich. Ebenso ist über Daphnienerkrankungen sehr wenig gearbeitet worden.

Eine echte Hefe als Krankheitserreger stellte METSCHNIKOFF (1884) bei *Daphnia magna* fest. Der Pilz wird von der Daphnie mit der Nahrung zusammen aufgenommen, und zwar im Zustande der Ascusbildung. Im Darm gibt jeder Ascus eine Spore ab. Die Sporen dringen durch die Darmwand in die Leibeshöhle und keimen seitlich aus. Durch Sprossung vermehren sich die Hefen weiter, bilden aber auch in der Leibeshöhle Asci. Beim Tode ist die Daphnie mit Sproßzellen und reifen Sporen angefüllt. METSCHNIKOFF nennt diese Hefe *Monospora bicuspidata*. Er berichtet dazu, daß die eindringenden Sporen von Blutkörperchen phagocytiert werden, und so die Infektion häufig verhindert wird, wenn nicht viele Sporen zugleich in die Leibeshöhle eindringen.

Späterhin wurde noch eine weitere Monosporaart von KEILIN (1920) entdeckt, und zwar die auf der Larve des Zweiflüglers *Dasyhelea obscura* WINNERTZ parasitierende *Monosporella unicuspidata*. Die Larven leben gewöhnlich in dem dicken braunen Saft, der die Wunden der Ulme und Roßkastanie erfüllt. Infiziert waren nur die Tiere, die von der Roßkastanie gesammelt wurden. Die schmalen ovalen Jugendstadien des Pilzes bilden gewöhnlich eine, mitunter zwei oder drei Knospen; diese trennen sich schnell und knospen weiter. Sofort nach Eindringen in die Larve verlängern sich die Zellen um das drei- bis vierfache zu Asci, die eine lange nadelförmige, an einem Ende verdickte Spore bilden. Die Zahl der infizierten Larven ist außerordentlich gering. KEILIN führt das darauf zurück, daß infolge der Undurchsichtigkeit der Larve nicht alle infizierten Tiere gefunden wurden, daß vielleicht aber auch eine Phagocytose stattfindet.

BÜTSCHLI (1876) fand bei dem freilebenden Nematoden *Tylenchus pellicidus* einen hefeartigen Parasiten, der allem Anschein nach der Gattung *Monospora* verwandt ist. Er bildet sowohl Sproßverbände als auch stabförmige Ascosporen. Die Angaben sind aber unzureichend.

Nahe verwandt der Gattung *Monospora* ist die Gattung *Nematospora*, die aber ausschließlich auf Pflanzen parasitiert. Sie unterscheidet sich von der Gattung *Monospora* dadurch, daß sie viel-sporige Asci bildet, und an den Sporen ein geißelförmiges Anhängsel aufweist. Bisher werden folgende Arten unterschieden:

Nematospora coryli wurde von PEGLION (1897) in den Cotyledonen der Haselnuß gefunden, kommt aber auch im Endosperm einiger tropischer Früchte vor. Sie bildet acht Ascosporen, die in Gruppen zu vier in jeder Hälfte des Ascus angeordnet sind.

Nematospora lycopersici, von SCHNEIDER (1916) bearbeitet, parasitiert auf den Früchten der Tomate. Sie stimmt mit *Nematospora coryli* wesentlich überein, nur entstehen die Asci hier nach Conjugation zweier Sproßzellen.

Nematospora phaseoli, von WINGARD (1925) auf den Samen von *Phaseolus lunatus* entdeckt. Die vegetative Phase ist typisch hefeartig, nur unter gewissen Bedingungen wird ein Mycel gebildet. Ein Ascus entsteht durch Conjugation zweier Sporen.

Nematospora gossypii, von ASHBY und NOWELL (1926) beschrieben als Parasit im Fruchtdosperm verschiedener tropischer Pflanzen, bildet 4—32, meist 12 Sporen, die in zwei Gruppen angeordnet sind. Der Thallus ist ein verzweigtes Mycel, in dem auch die Asci ausgebildet werden.

Nematospora nagpuri, von DASTUR (1930) bearbeitet, lebt in den Samenkapseln der Baumwollpflanze. Sie bildet zwei Zellformen: schmal-elliptische, die häufig sprossen, und kugelförmige, die nicht sehr stark sprossen. Ein Sproß der letzteren wird zum Ascus, der acht, in Kultur mitunter nur vier oder zwei Sporen bildet. In Kultur entstehen mitunter vielkernige Hyphen, doch sind diese sehr selten.

Alle *Nematospora*-Arten ließen sich ohne nennenswerte Schwierigkeiten auf ganz einfachen Nährböden kultivieren.

Weiterhin sind noch einige tierpathogene Hefen zu nennen, deren systematische Zugehörigkeit unklar ist. HARTIG (1892) beschreibt einen hefeartigen Pilz, der im Blute der Nonnenraupe (*Lymantria monacha*) vorkommt. Er ähnelt dem *Saccharomyces apiculatus*, ist aber größer. Sprossung kann an beiden Enden stattfinden. Kulturversuche sind stets mißglückt.

Eine Hefe, die das Fettgewebe von *Periplaneta orientalis* befällt, wurde von MERCIER (1906) entdeckt. Sie ist eiförmig oder rund und könnte ihrer Vermehrungsweise nach zur Gattung *Saccharomyces* gehören. Die Sprossung findet selten im Fettgewebe, sondern meistens im Blut statt. Der Organismus ist auf flüssigen und festen Substraten kultivierbar.

CHATTON (1913) fand einen Hefeparasiten auf *Drosophila funebris*, den *Coccidiascus legeri*. Er bildet durch Conjugation zweier Sproßzellen einen bananenförmigen Ascus. Dieser enthält acht nadel-

förmige Sporen, die in einer Gruppe beieinanderliegen. Die Ascosporen gleichen denen von *Monospora bicuspidata*.

HOLLANDE (1919) beschreibt kurz einen hefeartigen Parasiten, der im Blut von *Caloptenus italicus* (zur Gattung *Acridium*) vorkommt. Dieser färbt das sonst klare gelbe Blut milchig weiß und führt innerhalb von 5—7 Tagen den Tod herbei. Er hat cylindrische bis ovale Form und bildet in Kultur ein Mycel.

Zweifelhaft in ihrer tierpathogenen Bedeutung ist eine *Torula*-Art, die ROZSYPAL (1930) als weißlichen Belag zwischen den Körpersegmenten von *Chlorops taenioopus* fand. ROZSYPAL glaubt, daß es sich um einen Parasiten handelt, erklärt aber nicht, inwiefern der Organismus den Fliegen gefährlich wird. Jedenfalls wird nichts davon erwähnt, daß er in die Leibeshöhle eindringt.

Bekanntlich werden auch bei Säugetieren und beim Menschen eine Reihe von Krankheitserscheinungen durch Hefeinfektion hervorgerufen. Ein eingehender Bericht von BUSCHKE und JOSEPH über diese sog. Blastomykosen findet sich im Handbuch der pathogenen Microorganismen. Die in Europa gefundenen Blastomyceten sind alle als echte Hefen festgestellt worden. Die systematische Zugehörigkeit der amerikanischen Arten ist unsicher, doch werden auch diese als Hefen angesprochen, da sie größtenteils endogene Sporen bilden. Die sicher bestimmten Blastomyceten gehören zu drei Hefegattungen: *Saccharomyces*, *Willia* und *Debaryomyces*. Durch diese Pilze werden Erkrankungen der Haut, der Knochen und Gelenke, der inneren Organe und des Zentralnervensystems hervorgerufen.

Hinzuweisen bleibt schließlich noch auf die große Zahl der uns bekannt gewordenen Symbiosen mit hefeähnlichen Organismen bei Insekten. Die ausführlichste Zusammenstellung findet sich bei BUCHNER. Von ihnen interessiert für die vorliegende Arbeit besonders die Tatsache, daß die meisten sich wohl infolge ihrer stark spezialisierten Lebensweise sehr schwer kultivieren lassen.

Bei den Daphnien sind außer Hefen auch noch andere Pilze und verschiedene Microorganismen als Krankheitserreger bekannt geworden.

Bereits LEYDIG (1860) berichtet über vier verschiedene Krankheiten. Bei *Daphnia sima* fand er einen parasitischen Pilz von sehr kleiner, ovaler oder auch spindelförmiger Gestalt, dessen systematische Zugehörigkeit nicht feststeht. In der Hämolymphe von *Daphnia rectirostris* entdeckte er zwei Parasiten: einen länglichen, ringförmig gekrümmten und einen schlauchförmigen von verschiedener Länge, der unter Umständen auch blasenförmig auftrat. In der

Leibeshöhle von *Daphnia magna* und *Daphnia sima* beobachtete er mitunter einen echten, verästelten Fadenpilz, den er für nahe verwandt hielt mit *Sphaeria entomorrhiza*.

CLAUS (1876) entdeckte bei verschiedenen Arten Pilzsporen von der Art, wie sie LEYDIG im Blute von *Daphnia retrostris* gefunden hatte.

Einen Fadenpilz fand WEISMANN (1878) bei *Daphnia pulex*. Der Pilz, der eine gelbrote Färbung hervorruft, umlagert Darm und Ovar bis in die Füße hinein. Zwischen den Hyphen liegen zahllose kleine, stark lichtbrechende Körper.

Einige auf Daphnienarten parasitierende Sporozoen führt LABBÉ (1899) an. *Plistophora coccoidea* auf *Daphnia pulex*; *Plistophora obtusa* in der Leibeshöhle von *Simocephalus vetulus*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia reticulata* und *Daphnia longispina*; *Plistophora* sp. FRITSCH auf *Daphnia Kahlbergensis* und *Ceriodaphnia quadrangula*; *Plistophora virgula* auf *Daphnia pulex*. *Amoebidium cienkowskianum* als Ectoparasiten von *Simocephalus vetulus* und *Ceriodaphnia reticulata*. Und schließlich *Botellus Daphniae* in der Leibeshöhle von *Daphnia pulex*.

Aus allerneuester Zeit liegt eine Arbeit von JIROVEC (1932) vor, über eine Bakterieninfektion bei *Daphnia longispina*. Die in der Hämolymphe sich entwickelnden Bakterien machen die Tiere undurchsichtig und bewirken eine zartrosa Färbung. Drei Bakterientypen kommen vor, von denen zwei nur verschiedene Erscheinungsformen desselben Organismus sein sollen. Der dritte ist vielleicht ein selbständiger Organismus. Alle drei sind sehr schwer färbbar.

3. Äußeres Bild und Verbreitung der Krankheit.

In einer Anzahl gefangener Daphnien kann man ohne viel Mühe rein äußerlich die kranken Tiere an ihrer weißlichen Färbung erkennen. Bei mikroskopischer Betrachtung sieht man dann, daß diese Tiere erfüllt sind von in Klumpen zusammengeballten, hefeähnlichen Organismen, die frei in der Leibeshöhle liegen (Taf. 3 Fig. 1). Zerdrückt man erkrankte Daphnien, so wird man immer wieder überrascht durch die ungeheure Zahl, mit der der Parasit das Innere der Tiere erfüllt.

Zunächst scheint es so, als ob die Tiere durch den Hefebefall in keiner Weise in ihrem Befinden beeinträchtigt würden. Jedenfalls zeigt sich in ihrem äußeren Verhalten keine wahrnehmbare Veränderung. So konnte z. B. beobachtet werden, daß befallene Tiere zweimal kurz hintereinander Junge zur Welt brachten. Auch daß die Häutung trotz der Infektion in gewöhnlicher Weise vor sich

ging, ist einwandfrei festgestellt worden. Die Krankheit führt schließlich aber doch zum Tode. Erst kurz vor dem Eingehen kann man an dem Verhalten der Daphnien ihren Zustand erkennen. Sie schwimmen dann unruhig umher, ihre Bewegungen werden unregelmäßig, rasch und ruckartig ausgeführt. Das tritt aber erst dann ein, wenn die Tiere derartig von Hefe erfüllt sind, daß es höchst verwunderlich ist, wie derartig stark befallene Tiere überhaupt noch lebensfähig sind.

Um über die Verbreitung der Krankheit ein Bild zu bekommen, wurden etwa 200 Tümpel in der näheren Umgebung Rostocks nach Cladocerenarten systematisch untersucht. Hefebefall konnte nur in vier Tümpeln festgestellt werden, über deren Lage die beigegeführten Skizzen Aufschluß geben. Es handelt sich um schlammige Dorf-tümpel (Textfig. 2 u. 3) oder um ebenfalls sehr schlammhaltige Vieh-tränken (Textfig. 1 u. 4). In diesen vier Tümpeln fand sich hauptsächlich *Daphnia magna*. Daneben kamen aber auch noch andere Cladocerenarten mehr oder weniger reichlich vor, von denen in erster Linie die größeren für die Untersuchung herangezogen wurden, nämlich *Daphnia pulex*, *Daphnia psittacea*, *Simocephalus exspinosus* und *Simocephalus vetulus*. Die Hefe fand sich nur bei *Daphnia magna*. Damit ist festgestellt worden, daß der Parasit auf diese Art spezialisiert ist.

Bei der Untersuchung der Tümpel wurden noch vier weitere entdeckt, in denen *Daphnia magna* vorkam. In drei wurden derartig wenig Individuen gefangen, daß eventuell vorhandene befallene Tiere vielleicht übersehen worden sind. Im vierten fand sich *Daphnia magna* sehr zahlreich. Niemals konnte aber ein von der Hefe befallenes Tier festgestellt werden. Auch in einer aus diesen Tümpeln angesetzten Daphnienzucht, die etwa ein Jahr lang im Treibhaus (Kalthaus) gehalten wurde, trat niemals Hefebefall auf. Daraus kann gefolgert werden, daß der Parasit kein ständiger Begleiter von *Daphnia magna* ist.

Außer dieser Hefe wurden auf *Daphnia magna* noch zwei weitere Parasiten gefunden. Einer entspricht der *Monospora bicuspidata* METSCHNIKOFF. In drei Tümpeln fand er sich gemeinsam mit der hier beschriebenen Hefeerkrankung, außerdem in dem eben erwähnten hefefreien Tümpel. Der andere hat hefeartige, runde Form, nach der er zu den Torulahefen gestellt werden muß. Er wurde nur in bestimmter Jahreszeit in zwei Tümpeln gefunden, in denen auch die Daphnienhefe vorkommt. Über beide Parasiten wird am Schluß der Arbeit noch berichtet werden.

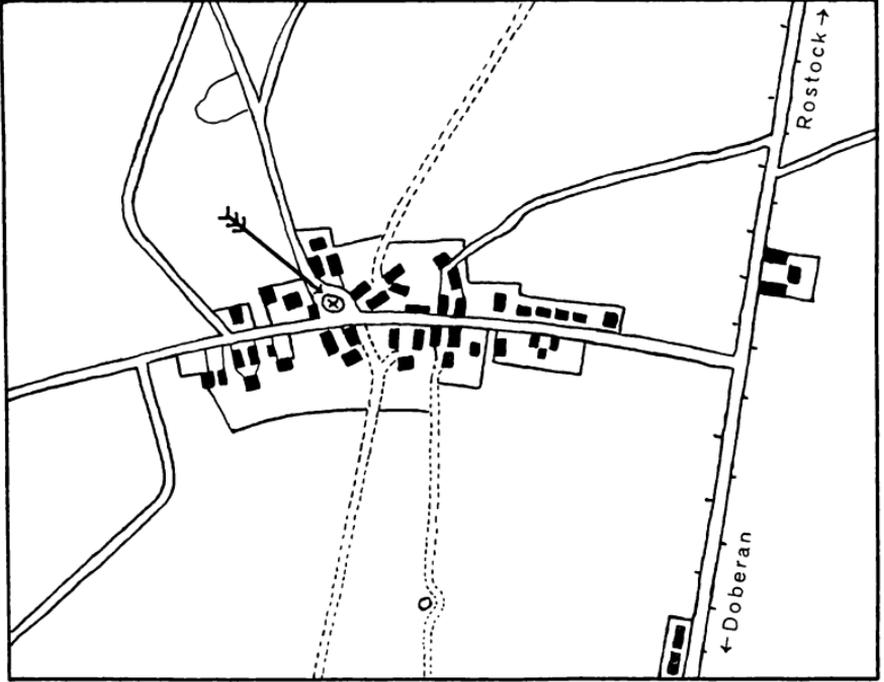


Fig. 2. SIEVERS HAGEN. 1:12500.

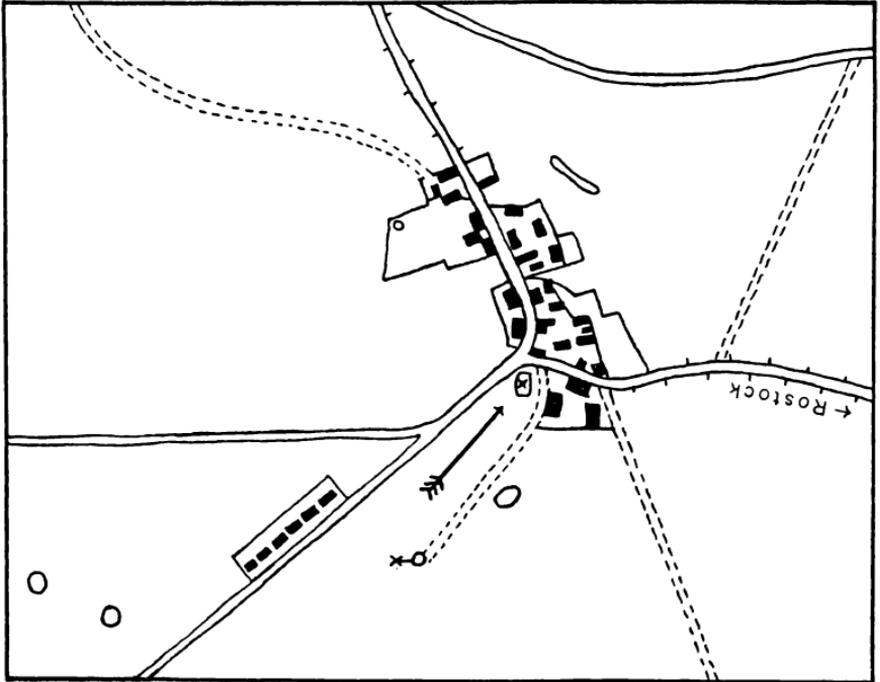


Fig. 1. DIERKOW. 1:12500.

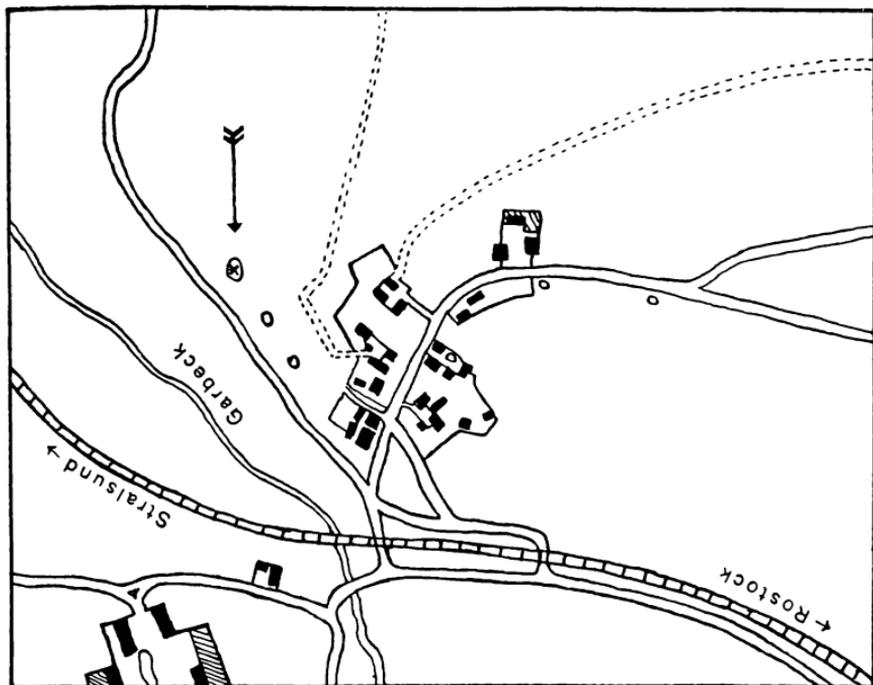


Fig. 4. RIEDAHL. 1 : 12 500.

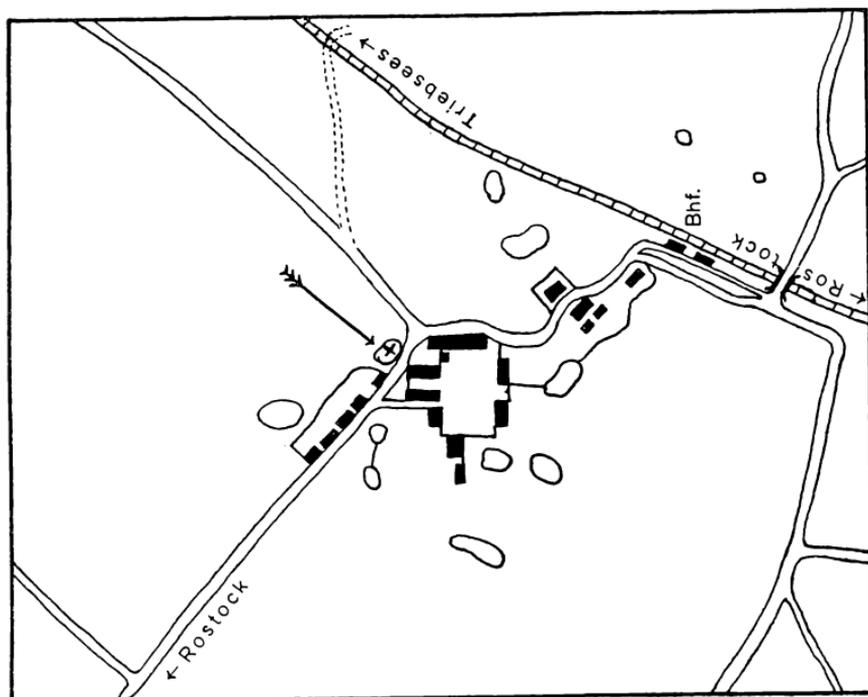


Fig. 3. ROGGEN TIN. 1 : 12 500.

Fig. 1—4. Lageskizzen von den Tümpeln, in denen Hefefall festgestellt wurde.

Das Auftreten der Krankheit scheint sehr von der Jahreszeit abhängig zu sein. Sie erscheint zuerst Ende April bis Mitte Mai, offenbar mit Beginn des wärmeren Frühlingswetters, und zwar tritt sie dann plötzlich sehr stark auf. Dieser Zustand hält im allgemeinen bis in den Dezember hinein an. Es scheint, daß vor allen Dingen die Temperatur den maßgebenden Faktor für die Begünstigung der Krankheit darstellt. Eine im Juli beginnende mehrwöchige Regenperiode mit ziemlich niedrigen Temperaturen setzte nämlich die Zahl der befallenen Tiere auf einmal merklich herab. Viele Tiere nahmen jetzt aus anderen Gründen weißliche Färbung an, die oft zu Verwechslungen führte. Teils hatten sie Fett gespeichert, teils waren sie von den beiden anderen schon erwähnten Parasiten befallen.

Sehr deutlich zeigt sich die Abhängigkeit der Hefekrankheit von der Jahreszeit in den eigentlichen Wintermonaten. Im Januar 1931 begann die Krankheit rapide abzuflauen, um bereits um die Mitte des Monats Februar ganz zu verschwinden. In diesen Monaten herrschte sehr niedrige Temperatur mit häufigem Frost. Ende April trat die Krankheit wieder in vollem Umfang in Erscheinung. Bei dem im Januar 1932 herrschenden warmen Sonnenwetter dagegen waren noch sehr viel befallene Tiere vorhanden. Erst Mitte März hörte der Hefebefall ganz auf. Da die Temperatur bis in den Mai hinein sehr niedrig blieb, trat die Erkrankung erst um die Mitte dieses Monats wieder hervor.

In den Monaten Januar bis März trat die Hefe sehr häufig mit der *Monospora* zusammen in ein und derselben Daphnie auf (Taf. 3 Fig. 2), so daß es fast den Anschein hatte, als ob beide nur verschiedene Erscheinungsformen desselben Organismus seien. Das kann aber nicht der Fall sein, da beide morphologisch scharf voneinander zu unterscheiden sind, und in einem Tümpel wohl die *Monospora*, niemals aber die Hefe gefunden wurde.

Die Dauer der Krankheit kann nicht genau angegeben werden, da frisch infizierte Tiere nicht als solche zu erkennen sind, auf der anderen Seite aber alle Versuche, gesunde Daphnien zu infizieren, fehlschlagen. Es blieb also lediglich die Möglichkeit, noch nicht sehr stark befallene Daphnien in Gläsern zu isolieren, um so makroskopisch den Fortgang der Infektion bis zum Verenden zu beobachten. Im Gewächshaus bei 10—14° C gehaltene Tiere starben nach einigen Tagen, und zwar ganz offensichtlich nicht an der Infektion. In einer Zimmertemperatur von 20—28° C konnten sich befallene Daphnien bis 20 Tage halten. Diese gingen offenbar nur an der Infektion zugrunde; denn die Kadaver waren immer von

Hefen restlos erfüllt. Rechnet man nun als Zeitraum vom Augenblick der Infektion bis zu dem Zeitpunkt, an dem diese einigermaßen sichtbar wird, an dem also die befallenen Tiere isoliert wurden, 10 Tage hinzu (dies dürfte ungefähr richtig, jedenfalls nicht zu hoch gegriffen sein), so würde sich als Dauer der Krankheit etwa die Zeit von 30 Tagen ergeben. Daß diese Berechnung für die im Freien lebenden Tiere zu hoch gegriffen sein dürfte, ist ziemlich klar, da wir ja sahen, daß die Jahreszeit großen Einfluß auf den Krankheitsverlauf hat. KORSCHULT gibt als Alter unserer niederen Süßwasserkrebse etwa die Dauer einer Sommerperiode, mindestens aber mehrere Monate an. Danach setzt also der Hefebefall das Lebensalter der betreffenden Tiere erheblich herab.

4. Morphologie und Kultur der Hefe.

In Quetschpräparaten von befallenen Daphnien zeigt sich die gewöhnliche Wuchsform der Hefe, die außerordentlich regelmäßig ist (Textfig. 5). Die Hefezellen haben birnen- bis eiförmige Gestalt;



Fig. 5. Normale Zellformen der Hefe. 3000 \times vergr.

mit wenigen Ausnahmen sind alle nach einem Pol etwas zugespitzt. Mitunter finden sich auch leicht gekrümmte Zellen, die dann aber ebenfalls einen runden und einen spitzeren Pol aufweisen. Die Hefe mißt in der Länge 4,5–6 μ , an der breitesten Stelle 2,3–3 μ .

Die Hefezellen enthalten eine Vakuole, die infolge der Lichtbrechung rötlich erscheint. Sie kann kreisrund sein und liegt dann im breiteren Ende der Zelle. Häufiger schiebt sie noch einen Fortsatz in den spitzeren Pol, der aber nicht so deutlich erkennbar ist. Es kommen jedoch auch Hefezellen vor, die mehrere Vakuolen enthalten. In solchen Fällen handelt es sich höchstwahrscheinlich immer um beginnende Teilungen. Die Zelle ist stets von einer Schleimhülle umgeben, die an Hand von Tuschepräparaten leicht nachgewiesen werden kann. Sie enthalten einen Zellkern, der sich nach Fixierung mit Chrom-Osmium-Essigsäure (nach FLEMMING) mit Eisenhämatoxylin färbt. Er ist stets der Wand angelagert, und hat länglich-ovale oder unregelmäßige Form (Textfig. 6). Thymonuclearreaktion hatte negativen Erfolg.

Die Art und Weise der Vermehrung der Hefe war aus den Quetschpräparaten nicht klar ersichtlich. Es wurden aber nicht selten Zellbildungen beobachtet, die auf Teilungsvorgänge hindeuten (Textfig. 7). Fast in jedem Quetschpräparat findet man



Fig. 6. Kernfärbungen mit Eisenhämatoxylin.
3000 \times vergr.

Zwillingsstadién, die von einer gemeinsamen Schleimhülle umgeben sind. Die beiden Zellen

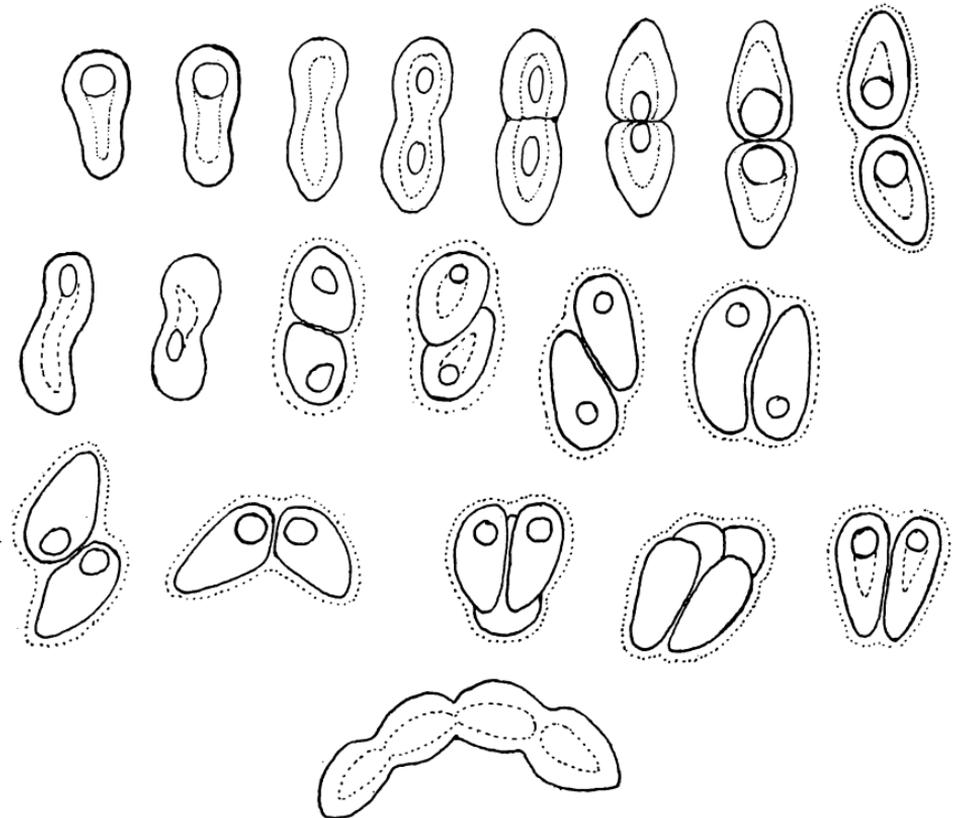


Fig. 7. Zweiteilung der Hefe. 3000 \times vergr.

haben verschiedene Lage zueinander. Meistens liegen sie längsseits aneinander, und zwar so, daß die entgegengesetzten Pole sich be-

rühren, doch können auch die gleichen Pole aneinander liegen. Mitunter berühren sich beide nur mit dem stumpfen Pol, und bilden einen Winkel, der in wenigen Fällen auch gleich 180° sein kann. Daneben finden sich ab und zu Hefezellen, die in der Mitte eingeschnürt sind. Ganz selten zeigen sich auch dreilappige Zellen, mitunter sogar vierlappige (Textfig. 8). Die Klärung dieser Erscheinungen gelang bei den Kulturversuchen.

Viel Mühe wurde darauf verwendet, Reinkulturen von der Hefe zu gewinnen. Diese Versuche sind leider völlig fehlgeschlagen. In verschiedenen Nährmedien konnte zwar manchmal ein geringes Wachstum der Hefe festgestellt werden, zu reichlicher Vermehrung ist es aber nie gekommen, vor allem deshalb, weil Bakterien sehr schnell die Kulturen überwucherten. Wenn wir an die ganz ähn-

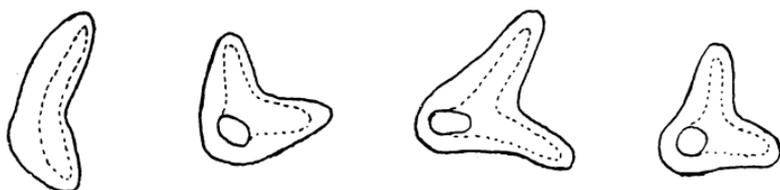


Fig. 8. Dreilappige Zellformen. $3000\times$ vergr.

lichen Erscheinungen bei symbiontischen Hefen denken, deren Kultur bisher auch nicht gelungen ist (siehe SCHWARZ, Über die Pilzsymbiose der Schildläuse), ist es an sich nicht sehr verwunderlich, daß dieser stark spezialisierte Parasit nicht zu intensivem Wachstum zu bringen war.

Auf Grund der parasitischen Lebensweise war anzunehmen, daß die Hefe im wesentlichen von organischen Stoffen ihren Umsatz bestreitet. Dementsprechend wurden die Nährsubstrate in der verschiedensten Weise aus Kohlehydraten, organischem Stickstoff und tierischem Eiweiß zusammengesetzt; in einigen Fällen wurden auch anorganische Salze verwendet.

1. Als organische Stickstoffquellen fanden 1 proz. Peptonlösungen und neutrales Hefewasser nach WILL Verwendung.

2. Reine Kohlehydratquelle war 3 proz. Malzlösung, die auch mit 2 Proz. Agar oder 10 Proz. Gelatine zur Anwendung kam.

3. Meist wurden Kohlehydrate und Stickstoffe vermischt:

a) 3 proz. Malzlösung + 1 Proz. Pepton; dasselbe auch mit 2 Proz. Agar oder 10 Proz. Gelatine.

b) 3 Proz. Glukose, 0,1 Proz. Asparagin, 0,5 Proz. Pepton, 2 Proz. Agar oder 10 Proz. Gelatine.

c) 5,8 Proz. Rohrzucker + 0,1 Proz. Pepton.

d) 10 Proz. Rohrzucker + 1 Proz. Traubenzucker mit verschiedenen Stickstoffquellen, nämlich 0,1 Proz. Glykokoll, Harnstoff oder Asparagin.

e) Neutrales Hefewasser + 10 Proz. Rohrzucker.

4. Fleischextrakt wurde in folgender Zusammensetzung gebraucht: Je 1 Proz. Agar, Pepton und Fleischextrakt, 0,5 Proz. Chlornatrium, 0,25 Proz. Glukose, dasselbe auch mit 10 Proz. Gelatine statt 1 Proz. Agar.

5. Da der Parasit auf *Daphnia magna* spezialisiert ist, war anzunehmen, daß dieses Tier ihm eine ganz bestimmte Nahrungsquelle bietet. Daher wurden auch Abkochungen von Daphnien mit verschiedener Beimischung ausprobiert:

a) Daphnienbrühe ohne Zusatz.

b) Schwache und konzentrierte Daphnienbrühe mit 2 Proz. Agar.

c) Schwache Daphnienbrühe mit 0,1 Proz. Asparagin, 0,5 Proz. Pepton, 1 Proz. Glycerin und 2 Proz. Agar oder 10 Proz. Gelatine.

d) Daphnienbrühe mit 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. Chlornatrium, 0,25 Proz. Glukose + 1 Proz. Agar.

6. Um den Hefen vitales Eiweiß zu bieten, wurde das Kammerwasser von Rinderaugen als Nährlösung verwendet, das den Augen von frisch geschlachteten Rindern mit Hilfe einer sterilisierten Kanüle entnommen wurde, nachdem zuvor die Einstichstelle mit Alkohol gereinigt und keimfrei gemacht worden war.

7. Alle unter 1—5 genannten Nährsubstrate wurden im Dampfstrom sterilisiert. Da beim Erhitzen die vorhandenen Stoffe einer durchgreifenden Veränderung unterliegen, war es kaum möglich, auf diesem Wege einen Nährboden zu finden, der dem natürlichen Substrat einigermaßen entsprach. Daher wurde die von SCHWEIZER (1932) angegebene Methode der Sterilisation durch Chloroformdämpfe ausprobiert. Das Nährsubstrat wurde hergestellt aus:

50 g getrockneten pulverisierten Daphnien,
 0,5 g Pepton,
 0,5 g Traubenzucker,
 0,1 g Asparagin,
 0,1 g Kaliumphosphat,
 0,1 g Magnesiumsulfat.

Dieses Gemisch wurde mit 1 Proz. Gelatinelösung versetzt und in PETRI-Schalen ausgegossen. Die Schalen blieben dann 7 Tage in einem Exsikkator, in dem ein Gefäß mit Alkohol + Chloroform

aufgestellt war. Dann kamen sie 2—3 Tage in einen 40°-Thermostat, wo die letzten Reste des Chloroforms verdunsten sollten. Bis auf eine waren alle Schalen steril.

Bei den Kulturversuchen stellte sich heraus, daß die Bakterien in ganz kurzer Zeit die Nährsubstrate überwucherten. Deshalb mußte ein Weg gefunden werden, um die Bakterienzahl zu verringern. Als wirksamste Methode stellte sich das Verfahren der sterilen Präparation heraus. Die Daphnien, aus denen Hefen entnommen werden sollten, wurden in 70 proz. Alkohol 1—2 Minuten gebadet und dann in 0,75 proz. Kochsalzlösung oder sterilem Aqua dest. abgespült. Nun mußte der Darm entfernt werden, da in diesem naturgemäß die meisten Bakterien enthalten sind. Die Präparation geschah unter dem Binokular auf einem abgeflamnten Objektträger. Mit einer abgeflamnten Präpariernadel wurde in die mittlere Bein-gegend, also an einer Stelle, wo der Körper nicht verletzt werden konnte, ein Einstich gemacht, um die Daphnie festzuhalten. Eine zweite Präpariernadel wurde in den Kopf unterhalb des Darmes eingepöhrt, und der Kopf mit einem Ruck abgerissen. In den meisten Fällen konnte der ganze Darm mit herausgerissen werden. Der restliche Teil der Daphnien lieferte nun das Impfmateriale. Der Erfolg war der, daß die Bakterien sehr zurückgedrängt werden konnten.

Noch ein anderes Verfahren sollte zu Reinkulturen verhelfen. Neutrales Hefewasser wurde mit Weinsäure in abgestufter Menge versetzt, und zwar 1—4 proz. Die Hefen wurden dann in Abständen von 2 Tagen durch die einzelnen Stufen hindurchgeführt. In einigen Fällen schien es so, als ob die Bakterien abgetötet wären. Übertrug man dann aber den Inhalt der betreffenden feuchten Kammern in einen Kolben mit Nährlösung, so stellte sich heraus, daß sich die Bakterien, wenn auch sehr langsam, doch wieder entwickelten. Sie überstanden also einen Zusatz von 4 Proz. Weinsäure. Dieser darf aber nicht höher sein, da (nach WILL) die meisten Hefen dadurch in ihrer Entwicklung stark, wenn nicht vollkommen gehemmt werden.

Auf den zur Kultur verwendeten festen Nährsubstraten konnte niemals Hefewachstum festgestellt werden. Zur genauen Kontrolle, ob die Hefe sich auf diesen Nährböden tatsächlich nicht vermehrte, wurden feuchte Kammern mit den verschiedenen Agar- und Gelatine-sorten hergerichtet, und mit Hefe geimpft. Nun konnten bestimmte Hefezellen unter dem Mikroskop fixiert und längere Zeit beobachtet werden. Nach 7 Tagen hatte sich auch nicht eine verändert. Damit war der Beweis erbracht, daß die Hefe auf diesen Nährböden nicht gedieh.

Mehr Erfolg war bei den Versuchen mit Nährlösungen vorhanden. Zwar wurde auch hier die eigentliche Absicht, Reinkulturen zu erzielen, nicht erreicht, aber es konnte doch die Art und Weise der Fortpflanzung der Hefe und in zwei Fällen sogar eine merkliche Vermehrung festgestellt werden.

Die Vermehrung der Hefe geht in der Hauptsache durch Teilung vor sich, und zwar auf sehr mannigfache Art und Weise. Am häufigsten ist die Zweiteilung (Textfig. 7). Weiter oben war schon die Rede von den Zwillingsstadien und eingeschnürten Zellen, die sich oft in Quetschräparaten fanden. Diese Bildungen traten in der Folgezeit immer wieder in Nährlösungen auf, so daß die in Textfig. 7 gezeigten Entwicklungsreihen zusammengestellt werden konnten. Danach kommt die verschiedene Aneinanderlagerung der Zwillingspaare durch die verschiedene Richtung der Durchschnürung (schräg oder gerade) zustande. Einigemal wurden auch drei aneinander-



Fig. 9. Dreilappige Bildungen aus einer Malztröpfchenkultur. 3000 \times vergr.

Die Zelle schnürt sich in der Mitte ein, die Vakuole beginnt sich zu teilen. Bevor dies ganz vollendet ist, bildet sich eine Membran, und die Teilung ist vollzogen. Beobachtet wurde dies in Malzlösung, in Rinderaugenwasser und in Zuckerlösungen.

Außer diesen einfachen Zweiteilungen kommen auch noch kompliziertere Teilungen vor, deren Vorstadien die bereits erwähnten drei- und vierlappigen Zellen sind. Die ersten Beobachtungen hierüber wurden wieder in einer Malztröpfchenkultur gemacht (Textfig. 9). Drei Zellen hatten eigenartige Umbildung erfahren. Es schien, als ob sich der spitze Pol der Zelle in zwei Hälften gespalten habe, die nun einen Winkel miteinander bildeten. Eine Zelle hatte bereits zwei Vakuolen. Weitere Veränderungen konnten nicht wahrgenommen werden.

Ähnliche Zellbildungen traten in Rinderaugenwasser auf. Sie bestanden hier aus drei völlig gleichen Lappen (Textfig. 10). In einer Kultur, die im Thermostaten bei 32^o gehalten wurde, konnte eine Zelle 15 Tage hindurch genau beobachtet werden. An ihrer

liegende Zellen beobachtet, einmal vier; die Zellen können sich also offenbar sofort weiter teilen. Das zeigen deutlich vier noch vollständig zusammenhängende Zellen. Der Vorgang der Teilung stellte sich als ein sehr einfacher heraus.

Gestalt änderte sich im Laufe dieser Zeit im wesentlichen nichts; dagegen zeigte die Vakuole tägliche Veränderungen. Sie lag zunächst in einem der drei Zipfel und zog sich nun langsam in die anderen hinein, indem sie dabei von Tag zu Tag blasser erschien. Am 5. Tage war sie kaum noch zu erkennen, erfüllte nun aber die ganze Zelle. Von nun an begann sie sich an verschiedenen Stellen wieder zu verdunkeln. Nacheinander nahm sie in den drei Zipfeln wieder deutlich rötliche Färbung an. Dazu kam noch ein ebenso deutlicher Fleck etwa in der Mitte der Zelle. Dann zeigte sich keine Veränderung mehr, da die Nährlösung wohl erschöpft war. Im Kammerwasser, das bei Zimmertemperatur im Dunkeln oder Tageslicht gehalten wurde, traten dieselben Erscheinungen auf. Diese Veränderungen der Vakuole können nur als die ersten Anzeichen der beginnenden Teilung gedeutet werden.

Das wurde in Versuchen mit neutralem Hefewasser bewiesen.

Hier konnte festgestellt werden, daß sich die Vakuole teilte, und etwa gleichzeitig damit die Ausbildung von Membranen zwischen den drei Zipfeln vor sich geht (Textfig. 11). Nach der vollständigen Teilung in drei Zellen lagen diese in einer gemeinsamen Schleimhülle zusammen, wobei sie kantig und gegeneinander abgeplattet erschienen. Daneben kamen auch Vierteilungen vor; hierbei teilte sich zunächst eine Zelle ab durch einen Vorgang, der bald einer Sprossung, bald einer Durchschnürung ähnlich sah. Der Rest der Mutterzelle teilte sich dann auf ähnliche Art und Weise wie die dreilappigen Zellen. Alle vier Tochterzellen blieben auch hier zunächst in einer gemeinsamen Schleimhülle.

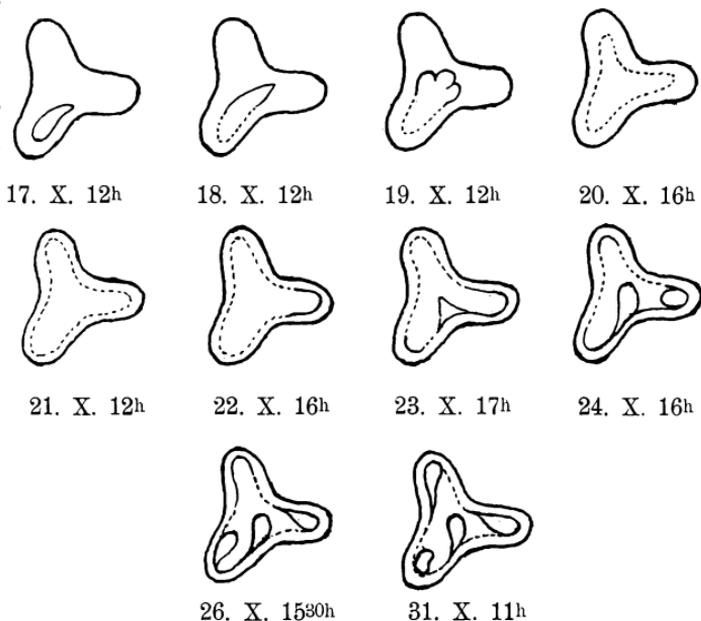


Fig. 10. Veränderungen der Vakuole in einer dreilappigen Zelle im Rinderaugenwasser.

Erwähnt werden müssen dann noch einige sehr unregelmäßige Bildungen (Textfig. 12), die in den verschiedensten Nährmedien beobachtet wurden. Sie lassen sich alle in gewisser Weise mit diesem oder jenem der geschilderten Teilungsvorgänge vergleichen.

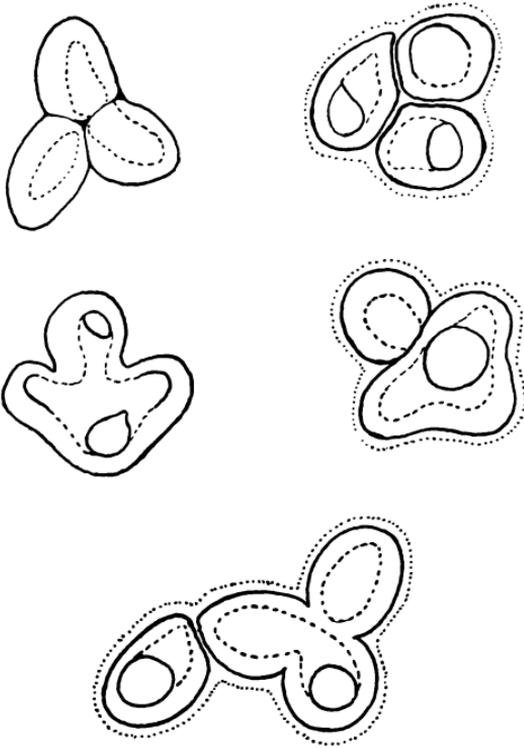


Fig. 11. Dreiteilung und Vierteilung der Hefe. 3000 \times vergr.

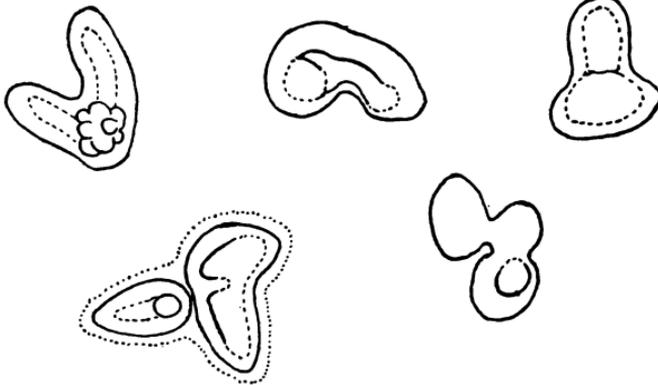


Fig. 12. Abnorme Teilungen der Hefe. 3000 \times vergr.

Sprossungen wurden nur äußerst selten gefunden. Im lebenden Tier kamen sie niemals vor. Nur in einigen Nährlösungen (besonders in neutralem Hefewasser) wurden einige beobachtet (Textfig. 13). Sie gingen immer am spitzen Pol der Zelle vor sich, entwickelten sich aber nicht sehr weit. Besondere Beachtung verdient eine Zelle, die auch an demselben Pol, aber seitlich aussproßte, und an einem kurzen Sproßhals zwei neue Zellen bildete.

Sonst war kein ausgesprochener Sproßhals vorhanden. Dauerbeobachtungen liegen hierüber nicht vor.

Eine sicher nicht normale Erscheinung, die später auch nicht wieder auftrat, wurde in einer Malzkultur beobachtet (Textfig. 14). Viele Hefezellen hatten plumpere Formen angenommen und wurden z. T. rund-oval. Manche vergrößerten sich offensichtlich, und nach einer Woche trat eine Riesenzelle auf, deren Zugehörigkeit zu der Daphnienhefe

ziemlich sicher ist, da erstens viele Übergangszellen von der normalen Hefezelle bis zur Riesenzelle vorhanden waren, zweitens aber auch keine derartig große Hefezelle vorher entdeckt worden war. Es muß also angenommen werden, daß sie sich aus einer kleineren entwickelt habe.

In einem Kolben mit neutralem Hefewasser konnte trotz der reichlich vorhandenen Bakterien eine merkliche Vermehrung der

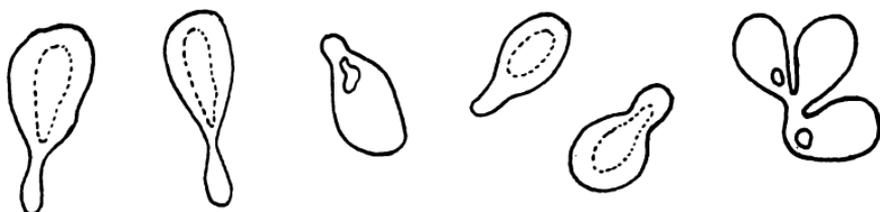


Fig. 13. Sprossungen der Hefe aus verschiedenen Nährmedien. 3000 \times vergr.

Hefe erreicht werden. Die Hefen wuchsen zunächst langsamer, dann intensiver. Die Vermehrung fand in der Hauptsache durch Zwei-

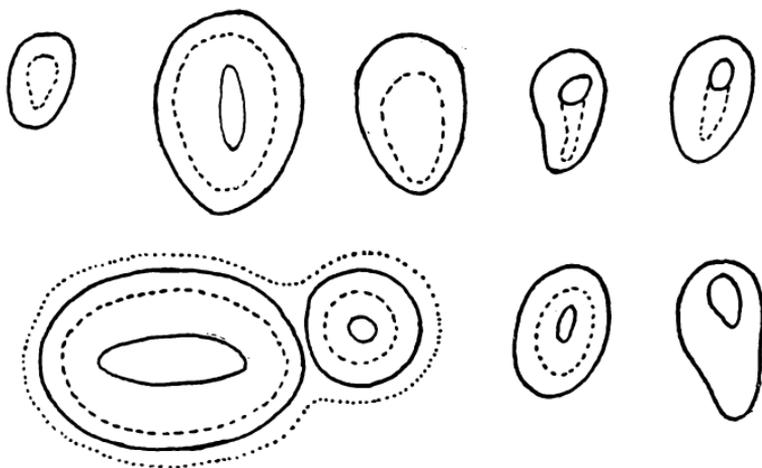


Fig. 14. Abnorme Zellbildungen aus einer Malztröpfchenkultur.

teilung statt. Die entstandenen Zellen waren meist etwas kleiner als die gewöhnlichen Zellen der Daphnienhefe. Nach etwa 2 Monaten hörte die Vermehrung auf. Lebende Zellen waren aber immer noch vorhanden.

Den gleichen Erfolg zeitigte der Versuch mit den in Chloroformdämpfen sterilisierten Platten. Auch hier zeigten sich zunächst Teilungsstadien der Hefe (Zweiteilungen). Auch die Zahl der vorhandenen Hefen deutete auf eine gewisse Vermehrung hin. Doch wucherten die Bakterien hier besonders stark, obwohl die Hefen

durch sterile Präparation gewonnen waren. Die Platten trockneten entweder ein oder gingen in Verwesung über.

Wenn es also auch geglückt ist, die Hefe zur Vermehrung zu bringen, so zeigen doch diese Versuche, daß die Hefe in ihrer Entwicklung mit der der Bakterien nicht Schritt halten konnte.

5. Pathologisch-anatomisches Krankheitsbild.

An lebenden Tieren, besonders aber an Mikrotomschnitten wurde die Erkrankung in pathologisch-anatomischer Richtung untersucht. Die Hefezellen liegen frei in der Leibeshöhle zu Klumpen geballt an den Geweben, an denen sie offenbar mittelst der erwähnten Schleimhülle haften bleiben. Es ist, abgesehen von der noch zu besprechenden Durchbohrung der Darmwand, nicht beobachtet worden, daß die Hefen in irgendwelche Gewebszellen eindringen. Es handelt sich also nicht um einen Zellschmarotzer, sondern um einen Liquorschmarotzer. Infolgedessen ist es leicht einzusehen, daß man die Hefen am häufigsten an den Geweben trifft, die den reichlichsten Stoffwechsel haben.

So findet man sie meistens in starker Ansammlung um den Mitteldarm herum, dessen Muskulatur sie unmittelbar aufliegen, und an den Eierstöcken (Taf. 3 Fig. 3). Sehr oft dringen sie auch zwischen die einzelnen Eier ein und umgeben diese ganz und gar, so daß sie als schwärzliche Klumpen erscheinen. Gar nicht selten findet man auch die Füße bis zu den Kiemen von Hefen erfüllt. Das Herz wird ebenfalls häufig von großen Hefeballen umlagert. Nicht so stark befallen wird das Abdomen, das meistens erst bei fortschreitender Infektion mehr und mehr in Anspruch genommen wird. Ist ein Fettkörper ausgebildet, so wird er nicht unbeträchtlich von der Hefe heimgesucht. Gemieden wird von den Parasiten meistens die Gegend um das Exkretionsorgan. Im Kopf wird hauptsächlich der obere Teil um den Darm und die Leberhörnchen herum befallen. Niemals fanden sich Hefen am Auge, äußerst selten an den Sinnesorganen. In den Ruderantennen wurden nur bei ganz stark befallenen Tieren Hefezellen beobachtet. Die Schale ist sehr oft von den Parasiten bevölkert, in manchen Fällen so stark, daß die Tiere äußerlich vollkommen weiß erscheinen.

Am lebenden Tier wurde beobachtet, daß die Hefen im Blutstrom mitgeführt werden. Dadurch haben sie die Möglichkeit, sich überall an den Geweben, die vom Blutstrom berührt werden, festzusetzen. So findet man sie auch häufig an den Muskelsträngen

und Bindegeweben. Überhaupt erklärt sich hierdurch die mitunter sehr zerstreute Lage der einzelnen Hefeansammlungen.

Auch im Darmlumen wurden zwischen der aufgenommenen Nahrung oft unverdaute Hefezellen gefunden. Dazu weisen in einer ganzen Reihe von Schnitten viele Darmzellen besondere Zelleinschlüsse auf, die ohne weiteres als Mikroorganismen erkennbar sind (Taf. 3 Fig. 4). Sie färben sich genau so wie die Hefe, haben auch in den meisten Fällen deren Form, bleiben aber in der Größe sehr oft erheblich hinter dieser zurück. Dennoch sind es offenbar besondere Wuchsformen der Hefe, die vielleicht im Begriff sind, vom Darmlumen her in die Leibeshöhle einzudringen. Besondere Veränderungen waren in diesen Darmzellen offenbar nicht vor sich gegangen. Fast alle wiesen einen gesunden Kern auf. Wo dieser nicht vorhanden war, war er offenbar weggeschnitten worden.

Mikrotomschnitte von Daphnien mit Sommer- und Wintereiern ergaben, daß die Eier von der Hefe nicht befallen sind. Oft sind wohl die den Brutraum umgebenden Gewebe stark von der Hefe parasitiert, niemals ist aber eine Hefezelle im Brutraum zu entdecken. Auch ist an keinem Schnitt beobachtet worden, daß die Hefen imstande sind, durch das Integument nach außen zu gelangen. Dasselbe ist bei den Ephippien der Fall. Die Ephippien bildenden Tiere sind oft sehr stark infiziert; in vielen Fällen ist dann die Ephippienschale in Mitleidenschaft gezogen (Taf. 3 Fig. 5). Die Hefen liegen hier meistens zwischen der inneren und äußeren Hypodermis, in einigen wenigen Fällen sind sie bis zur Chitinlamelle vorgedrungen. Die Loge selbst ist aber immer hefefrei.

6. Die Infektion der Daphnie.

Nicht sehr einfach war es, die Frage zu klären, wie die Hefe in den Daphnienkörper eindringt. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten die Hefen mit der Nahrung zusammen aufgenommen werden und durch die Darmwand in die Leibeshöhle eindringen. Andererseits wäre eine Infektion der Eier der kranken Tiere möglich. Näherliegend ist die erstere Annahme, da ja auch bei der von METSCHNIKOFF entdeckten Hefekrankheit die Parasiten durch die Darmwand eindringen.

Die Möglichkeit einer Eiinfektion muß von vornherein sehr zweifelhaft erscheinen, da ja die Mikrotomschnitte von befallenen Daphnien mit Sommer- und Wintereiern deutlich zeigen, daß die Eier bzw. Embryonen nicht befallen sind. Auch wurden Hefen

weder im Brutraum noch in der Loge des Ehippiums gefunden. Es könnte hier aber doch der Einwand gemacht werden, daß die Ehippienschale bei befallenen Tieren meistens Hefen in ihren Hohlräumen aufweist, oft sogar im inneren Teil. Das kann aber nicht von großer Bedeutung sein. Denn genau so wenig, wie beobachtet wurde, daß die Hefen das Integument durchdringen, dürfte es den Parasiten möglich sein, die Chitinlamelle zu durchbrechen. Sie können also günstigstenfalls dann frei werden, wenn das Tier beim Schlüpfen die Schale zerstört. Bis zu diesem Augenblick hat aber die Daphnie bereits einen derartigen Entwicklungsgrad erreicht, daß eine direkte Infektion so gut wie ausgeschlossen ist.

Zum Beweise dieser Annahme dienten zwei Versuche mit lebenden Daphnien. Befallene Tiere mit ausgebildeten Ehippien wurden in Gläsern isoliert und halbtägig kontrolliert. Die abgeworfenen Ehippien wurden in einem hefefreien Aquarium gesammelt, und bei Zimmertemperatur von 20—28° gehalten. Beim Schlüpfen war kein Tier von der Hefe befallen. Auch später, als die Tiere sich stark vermehrt hatten, wurde keine infizierte Daphnie in dem Aquarium gefunden, obwohl doch die Ehippien von einwandfrei infizierten Tieren stammten.

Bei Zimmertemperatur isolierte, befallene Daphnien bildeten meistens Sommereier. Die ausgeschlüpften jungen Tiere wurden in verschiedenen Altersstadien geschnitten. Keines war von der Hefe befallen. Nur einmal wurde ein 6—8 Tage altes Tier gefunden, das Hefen mit sich führte. Ein von diesem angefertigtes Quetschpräparat zeigte, daß der Darm stark mit Hefen besetzt war. Wahrscheinlich waren diese von hier aus in die Leibeshöhle eingedrungen. Einmal fand sich auch der Kadaver einer Jungdaphnie, die an Hefeinfektion zugrundegegangen war. Der Größe nach mußte das Alter dieses Tieres etwa 8—10 Tage betragen. Von ganz jungen Daphnien zeigte aber kein einziges Tier Hefebefall, obwohl sie alle von infizierten Muttertieren stammten. Es steht also fest, daß die Sommereier auch nicht zur Verbreitung der Krankheit in Frage kommen.

Demnach ist also nur noch die Möglichkeit einer Infektion durch den Darm gegeben. Hierfür spricht zunächst schon der Umstand, daß häufig Hefen im Darmlumen gefunden wurden, die offenbar nicht verdaut wurden; denn sie befanden sich des öfteren schon im Enddarm, wo keine wesentliche Verdauung mehr stattfindet. Ferner zeigen ja auch die Darmzellen in allen Abschnitten des Darmes häufig besondere Zelleinschlüsse, die wir als Hefezellen an-

sprechen müssen, die gerade im Begriff sind, vom Darmlumen in die Leibeshöhle überzutreten. Taf. 3 Fig. 4 zeigt einen Querschnitt durch den Enddarm einer befallenen Daphnie, der den Übertritt der Hefe in die Leibeshöhle sehr gut veranschaulicht. Einige Zellen liegen noch im Darmlumen, die Darmzellen sind zum größten Teil von Hefen erfüllt. Kleinere Hefenester befinden sich bereits zwischen Darmmuskulatur und Bindegewebe. Textfig. 15 zeigt einen Abschnitt

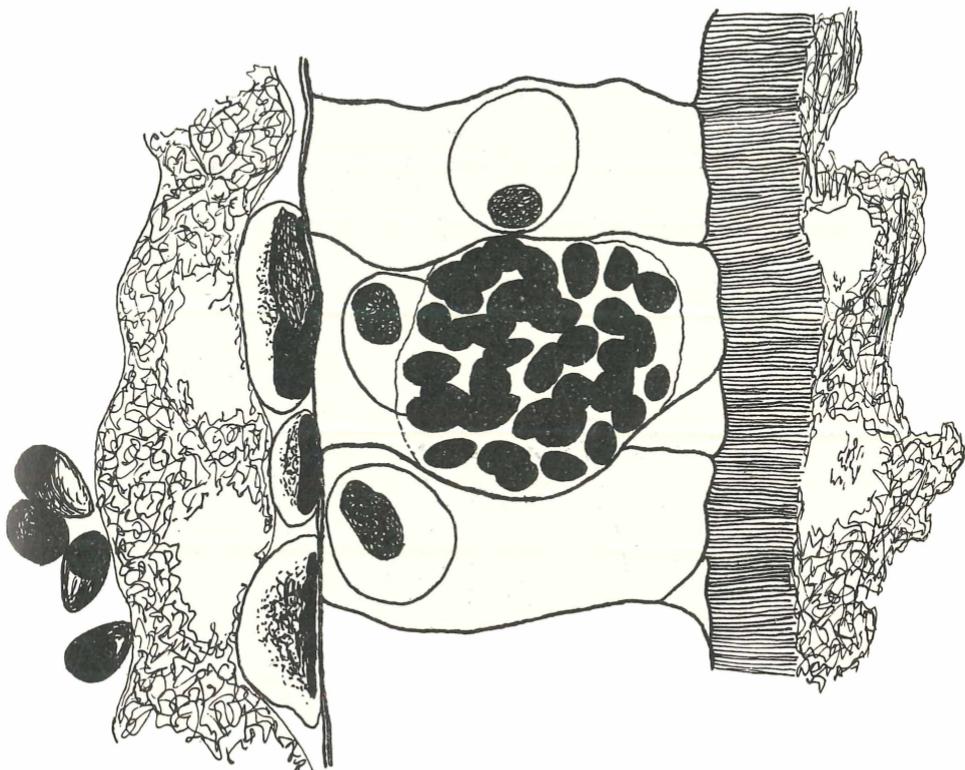


Fig. 15. Durchtritt der Hefe durch den Darm. Rechts: Darmlumen und Stäbchensaum, links: Ringmuskulatur (quergeschnitten) und Lymphraum. Daran anschließend einige Hefezellen von normaler Größe im Bindegewebe. 3000 \times vergr.

aus der Darmwand noch stärker vergrößert, daneben einige Hefezellen aus dem Gewebe der Daphnie in derselben Vergrößerung.

Nach diesen Ergebnissen kann es nicht mehr zweifelhaft sein, daß die Parasiten durch die Darmwand in die Leibeshöhle eindringen. Wie die verschiedenen Mikrotomschnitte zeigen, kann dies in allen Teilen des Darmes geschehen.

Um den Beweis, daß die Hefen durch die Darmwand in die Leibeshöhle eindringen, vollständig zu erbringen, wurden mit gesunden Daphnien Infektionsversuche angestellt. Als Versuchsmaterial dienten Daphnien aus den Tümpeln, in denen niemals von der Hefe befallene Tiere gefangen wurden. Allerdings kam hier die *Mono-spóra bicuspidata* vor, aber es war aus anderen Tümpeln nicht genügend einwandfreies Material zu beschaffen, so daß dies mit in Kauf genommen werden mußte.

Zunächst wurden zwei Versuchsreihen angesetzt; eine im Gewächshaus (Kalthaus) in Aquarien, die mit Seesand und Wasserpflanzen hergerichtet waren, die andere bei Zimmertemperatur in Gläsern mit Leitungs- oder Tümpelwasser. Als Infektionsmaterial dienten zerquetschte befallene Daphnien. Im Gewächshausversuch starben alle Tiere innerhalb von 3 Tagen, im Zimmer lebten sie bis zu einer Woche, Hefebefall war bei keinem Tier festzustellen, alle waren aus anderen Ursachen eingegangen.

Das frühe Verenden der Versuchstiere konnte den Grund haben, daß aus dem Glas herausdiffundierende Stoffe das Wasser verunreinigten. Daher wurden in Zukunft die Gläser und Aquarien mit einer dünnen Paraffinschicht ausgegossen.

Außerdem entsprach das Infektionsmaterial offenbar nicht den natürlichen Verhältnissen. Entweder waren, nämlich befallene Daphnien einfach durch Zerquetschen getötet worden, oder es wurden tote Tiere verwendet, die infolge ungünstiger Lebensbedingungen frühzeitig verendet waren. In freier Natur ist aber der Entwicklungsgang doch folgender: Wenn die Krankheit ihren Höhepunkt erreicht hat, verendet die Daphnie und sinkt zu Boden. Durch die Verwesung werden die Hefen allmählich frei und liegen nun im Detritus des Tümpels. Da dem Organismus nunmehr seine spezifische Nahrungsquelle, die ihm die Daphnie doch offenbar bietet, fehlt, ist mit Bestimmtheit anzunehmen, daß die Hefe auf dem Boden des Tümpels eine Hungerperiode durchmacht. Es wäre möglich, daß nur solche im Hungerzustand befindlichen Hefen eine Infektion bewirken können.

Solches Infektionsmaterial wurde auf folgende Weise hergestellt. Aus einem Tümpel, in dem die Krankheit vorherrschte, wurde eine große Anzahl Daphnien gefangen und im Mörser zu Brei gestampft. Der Brei wurde in sterile PETRI-Schalen ausgegossen und 2 Monate lang unter ständiger Kontrolle aufbewahrt. Die Hefen überstanden die Verwesung gut. Sie vermehrten sich so gut wie gar nicht, einige degenerierten; am Schluß des Versuches zeigten die meisten

Hefezellen fast keine morphologischen Veränderungen, nur waren sie nicht mehr ganz so groß wie früher. Das dürfte die Annahme einer Hungerperiode bestätigen.

Der ganze Brei wurde nun in ein Aquarium mit sterilem Tümpelwasser ausgegossen. Etwa 20 gesunde Tiere wurden eingesetzt und unter genaue Kontrolle genommen. Am 7. Tage waren zwei Tiere von der *Monospora* befallen, die ja in dem Tümpel, aus dem das zu infizierende Material stammte, auftrat. Von der Daphnienhefe wurde kein Tier infiziert. Der Versuch dauerte etwa einen Monat, während dessen sich die Daphnien stark vermehrten. Schließlich starben alle ab, ohne daß die Hefe die Ursache ihres Eingehens war. Die Untersuchung des Detritus ergab, daß Hefen immer noch in gesundem Zustand vorhanden waren.

Für den nun folgenden Versuch wurde das Infektionsmaterial auf noch einfachere Art und Weise gewonnen. Außerdem wurde an Hand von Mikrotomschnitten eine genaue Kontrolle durchgeführt. In dem Versuchsaquarium wurden befallene Daphnien solange gehalten, bis alle an der Infektion zugrundegegangen waren. Einige Tage später, als die Kadaver verweset sein mußten, wurden gesunde Tiere eingesetzt. Am 3. Tag wurden mehrere Tiere fixiert. Von da ab jeden Tag, später in größeren Abständen. Der Versuch wurde 20 Tage lang beobachtet. Die Schnittbilder zeigten, daß die Hefen mit der Nahrung zusammen aufgenommen worden waren. Am 3. Tag waren noch nicht allzu viel Hefen vorhanden; bedeutend mehr waren es am 4. Tag. Dann nahm die Zahl wieder ab; am 8. Tag waren überhaupt keine Hefen mehr im Darmlumen zu finden. Ein Eindringen in die Darmwand war an keinem Schnitt ersichtlich; vermutlich wurden die Hefen unverdaut wieder abgegeben.

Dieser Versuch schien fast das Gegenteil von dem, was die cytologischen Befunde erbracht hatten, zu beweisen, so daß die Annahme einer Fraßinfektion zeitweilig sehr in Frage gestellt wurde. Ein Zufall kam hier zu Hilfe. Ein Aquarium, das im Gewächshaus zu Versuchen gedient hatte, war mit in das Untersuchungszimmer gesetzt worden, da alle befallenen Tiere bis auf eins binnen 2 Tagen gestorben waren. Hier stand das Aquarium 6 Wochen lang, ohne beachtet zu werden. In der Zwischenzeit hatte sich die eine überlebende Daphnie sehr stark vermehrt, so daß eine ganze Anzahl von Individuen jeden Alters vorhanden war. Unter diesen war ein nicht geringer Teil von der Hefe befallen, und zwar von den ausgewachsenen Tieren die meisten. Von jeder Altersstufe wurden einige Tiere fixiert und geschnitten. Die Untersuchung ergab, daß von

den jüngeren Tieren auch nicht eines von der Hefe heimgesucht war, während mit zunehmendem Alter der Prozentsatz an kranken Tieren immer größer wurde. Daß hier die Infektion über das Ei vor sich gegangen sein sollte, ist ausgeschlossen. Denn wenn die Infektion im Ei erfolgt wäre, müßte wenigstens bei einigen Jungtieren der Parasit festgestellt werden können, auch wenn er vielleicht erst in einem späteren Altersstadium zur Entwicklung käme. Das ist aber erwiesenermaßen nirgends der Fall. Für eine Fraßinfektion spricht, daß das Aquarium genügend Infektionsmaterial enthalten mußte, da es ja mit befallenen Daphnien besetzt gewesen war. Die Frage, warum in diesem Fall die Infektion gelang, während sie bei den vorhergegangenen Versuchen doch stets ausblieb, kann man vielleicht damit beantworten, daß in dem betreffenden Aquarium die Lebensbedingungen den natürlichen Verhältnissen besser entsprachen. In diesem Aquarium hatte sich nämlich, da es schon sehr lange stand, infolge reichlicher Verwesung eine dichte Detritusschicht gebildet. Außerdem waren die infizierten Daphnien bereits vor 6 Wochen verwendet und die Hefen dadurch für eine Infektion vielleicht geeigneter.

Aus diesen Versuchen ergibt sich mit großer Sicherheit, daß die Infektion durch Aufnahme der Hefen mit der Nahrung vor sich geht.

7. Andere Hefeparasiten der Daphnien.

Wie schon eingangs erwähnt wurde, fanden sich auf *Daphnia magna* noch zwei andere Parasiten, die allerdings nicht sehr eingehend untersucht wurden. Beide sind von der Daphnienhefe scharf zu unterscheiden, so daß Verwechslungen ausgeschlossen sind.

Von dem einen ist bereits gesagt worden, daß er mit dem von METSCHNIKOFF entdeckten Hefepilz *Monospora bicuspidata* identisch ist (Textfig. 16). Zunächst stimmt schon die Form wesentlich mit diesem Parasiten überein. Die Sporezellen zeigen allerdings meistens körnigen Inhalt, von dem METSCHNIKOFF nichts erwähnt. Dagegen gleichen die Sporen genau denen von *Monospora*. Besonders war das von METSCHNIKOFF erwähnte im dickeren Ende des Ascus liegende Körnchen stets vorhanden. Es wurde mit den meisten vorher genannten Nährsubstraten versucht, den Parasiten zu züchten, wobei aber nicht der geringste Erfolg erzielt wurde. Auch METSCHNIKOFF war die Kultur des Parasiten nicht geglückt. Der Organismus färbte sich nur nach GRAM.

Der zweite fremde Parasit (Textfig. 17) wurde nur im August—September einige Male in zwei Tümpeln gefunden, in denen auch die Daphnienhefe vorkam. Er hat runde bis breitovale Form und

zeigt stets eine stark lichtbrechende Vakuole, die immer exzentrisch liegt. Er färbt sich nach GRAM intensiv, nimmt aber auch HEIDENHAIN-Hämatoxylin an. Der Kern liegt ebenfalls exzentrisch auf der anderen Seite der Zelle gegenüber der Vakuole. In der Leibeshöhle der

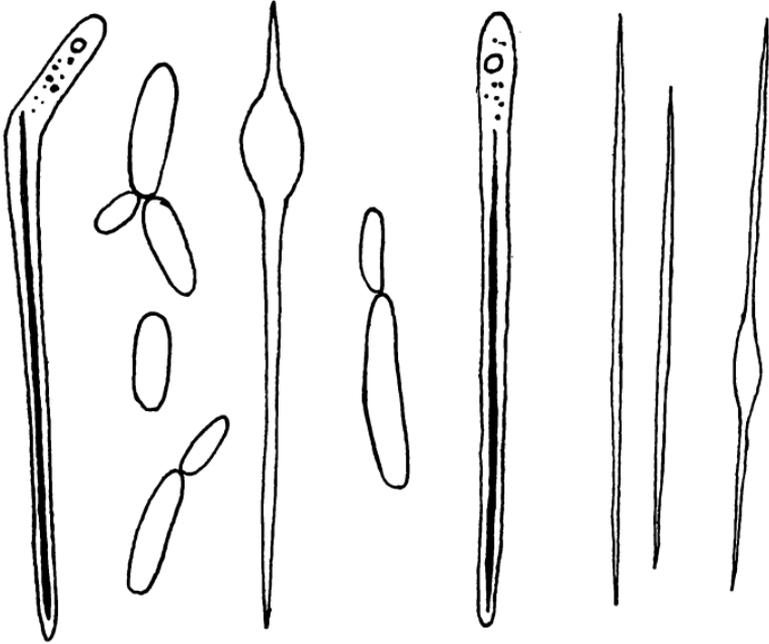


Fig. 16. Sporezellen, Asci und Sporen der *Monospora bicuspadata*.

Daphnie liegt der Parasit genau so verstreut wie die *Daphnienhefe*, kommt jedoch nicht mit dieser zusammen in einem Tiere vor. Kulturversuche schlugen alle fehl. Offenbar gehört er zu den Torulaarten.

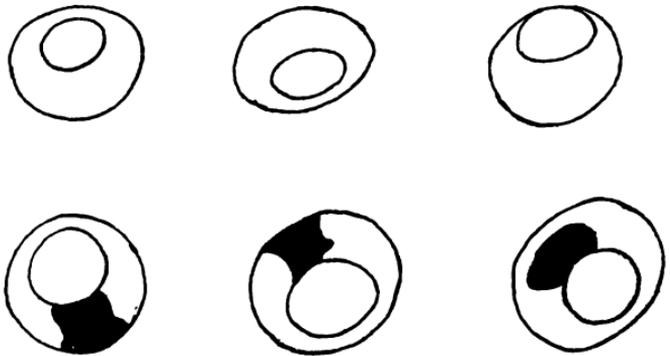


Fig. 17. Zellen des zweiten fremden Parasiten, die unteren nach Färbung mit Eisenhämatoxylin.

8. Systematische Zugehörigkeit.

In den vorangegangenen Ausführungen ist der behandelte Parasit stets als Hefe bezeichnet worden. Wenn man Quetschpräparate erkrankter *Daphnien* betrachtet, fällt sofort die gleichmäßige Form

des Parasiten auf, der nur in seltenen Fällen Vermehrungsstadien zeigt. Ähnliche Formen haben auch die Sporen verschiedener Microsporidienarten, die Daphnien infizieren, etwa Angehörige der Gattungen *Plistophora* und *Nosema*. Da aber in den Kulturversuchen und gelegentlich auch in zerquetschten Daphnien typische Vermehrungsstadien des Parasiten gefunden wurden, ist an eine Verwechslung mit derartigen Microsporidien nicht zu denken.

Die Hauptvermehrungsart des Parasiten ist Spaltung, nur ganz selten bildet er kurze Sproßverbände. Daraufhin wäre man geneigt, den Organismus in die Gruppe der Schizosaccharomyceten einzugliedern. Aber gegen diese Eingliederung lassen sich doch Bedenken geltend machen. Nie wurden Sporen oder sporenähnliche Stadien bei ihm beobachtet, wie sie für die Mehrzahl der typischen Hefen charakteristisch sind. Da ja nun auch viele Pilze aus anderen Verwandtschaftskreisen hefeähnliche Stadien bilden, ist es möglich, daß die Zugehörigkeit dieses Organismus vielleicht an ganz anderer Stelle zu suchen sein muß. Eine sichere Entscheidung darüber ist daher im Augenblick noch nicht möglich. Immerhin ist die Zuordnung zu den Schizosaccharomyceten vielleicht die wahrscheinlichste. Von einer Namengebung des Organismus sehen wir in Anbetracht seiner unsicheren systematischen Stellung vorläufig ab.

9. Zusammenfassung.

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Ergebnisse herauszuheben:

1. Der Parasit ist eine Hefe, die wahrscheinlich zu den Schizosaccharomyceten zu rechnen ist.
2. Er ist ein Liquorschmarotzer, der zum Tode führt. Der Tod tritt etwa nach einem Monat ein.
3. Die Hefe ist auf *Daphnia magna* spezialisiert, tritt jedoch nicht in allen Gewässern auf, in denen *Daphnia magna* vorkommt.
4. Reinkulturen waren von der Hefe nicht zu bekommen, da die Bakterien nicht ausgeschaltet werden konnten, doch wurde in einigen flüssigen Nährmedien Hefewachstum festgestellt. Feste Nährsubstrate waren zur Kultur völlig ungeeignet.
5. Die Vermehrung geht durch Teilung vor sich; Sprossungen wurden nur in ganz wenigen Fällen in Kultur beobachtet.
6. Die Infektion wird nicht auf die Eier übertragen. Die Hefe dringt durch die Darmwand in die Leibeshöhle ein.

Literaturverzeichnis.

- ASHBY, S. F. u. NOWELL, W. (1926): The fungi of stigmatomycosis. *Ann. of Bot.* Vol. 40.
- BUCHNER, P. (1930): Tier und Pflanze in Symbiose. Berlin.
- BUMP (1925): Observations on growth of *Coccidioascus immitis*. *Journ. of infect. dis.* Vol. 36.
- BUSCHKE, A. u. JOSEPH, A. (1928): Die Sproßpilze. *Handb. d. path. Micr.* Bd. 5.
- CHATTON, L. (1913): *Coccidioascus Legeri*. *C. R. Soc. Biol. Paris* T. 75.
- CLAUS, C. (1876): Zur Kenntnis der Organisation und des feineren Baus der Daphniden. *Zeitschr. f. wiss. Zool.* Bd. 27.
- DASTUR, J. F. u. SINGH, J. (1930): A new *Nematospora* on cotton bolls in the Central Provinces (India). *Ann. Mycologica* Vol. 28.
- EKBLOM, T. (1931): Cytological and biochemical researches into the intracellular symbioses in the intestinal cells of *Rhagium inquisitor*. *Skand. Arch. Phys.* Vol. 31.
- EMIG, W. H. (1916): The occurrence in nature of certain yeastlike fungi with reference to their possible pathogenicity in the higher animals. *Ann. of the Missouri Bot. garden* Vol. 3.
- ESCHERICH, K. (1900): Über das regelmäßige Vorkommen von Sproßpilzen in dem Darmepithel eines Käfers. *Biol. Zentralbl.* Bd. 20.
- GÄUMANN (1926): Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena.
- GROSSMANN, H. (1930): Beiträge zur Kenntnis der Lebensgemeinschaft zwischen Borkenkäfern und Pilzen. *Zeitschr. f. Parasitenk.* Bd. 3.
- HARTIG, R. (1892): Niedere Organismen im Raupenblute. *Forstl. natur-wiss. Zeitschr.* Heft 3.
- HECHT, O. (1928): Über die Sproßpilze der Ösophagusausstülpungen und über die Giftwirkungen der Speicheldrüsen von Stechmücken. *Arch. f. Schiffs- u. Tropenh.* Bd. 32.
- HOLLANDE, A. CH. (1919): Formes levures pathogènes observées dans le sang d'*Acridium*. *C. R. Acad. Sci. Paris* T. 168.
- JIROVEC, O. (1932): Über eine Bakterieninfektion der *Daphnia longispina*. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 77 H. 1.
- KEILIN, D. (1920): On a new saccharomycete *Monosporella unicuspidata*. *Parasitology* Vol. 12.
- KNIEP, H. (1928): Sexualität der niederen Pflanzen.
- LABBÉ, A. (1899): Sporozoa. *Das Tierreich* 5. Lief. hrsg. v. d. deutsch. zool. Gesellsch. Berlin.
- LEYDIG (1860): Naturgeschichte der Daphniden.
- LINDNER, P. (1909): Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin.
- MERCIER, L. (1906): Un organisme à forme levure parasite de la Blatte (*Periplaneta orientalis*). *C. R. Soc. biol. Paris* T. 16.
- METSCHNIKOFF, E. (1884): Über eine Sproßpilzkrankheit der Daphnien. *Arch. f. pathol. Anat. u. Phys.* Bd. 96.
- PEGLION, V. (1901): Über die *Nematospora coryli*. *Zentralbl. f. Bakt.* 2. Abt. Bd. 7.
- RICHTER, G. (1928): Untersuchungen an Homopterensymbionten. *Zeitschr. f. morph. Ök. d. Tiere* Bd. 10.

- ROZSYPAL, J. (1930): Ein Beitrag zur Vergesellschaftung und Überwinterungsmöglichkeit bei den Chloropidaceen. Zeitschr. f. Insektenbiol. Bd. 25.
- SCHNEIDER, A. (1916): A parasitic Saccharomycete of the tomato. Phytopathol. Bd. 6.
- SCHWARZ, W. (1924): Untersuchungen über die Pilzsymbiose der Schildläuse. Biol. Zentralbl. Bd. 44.
- SCHWEIZER, G. (1932): Über die Kultur von *Rhytisma acerinum*. Planta, Arch. f. wiss. Bot. Bd. 16 H. 2.
- SULČ, K. (1910): „Pseudovitellus“ und ähnliche Gewebe der Homopteren sind Wohnstätten symbiontischer Saccharomyceten. Sitz.-Ber. d. kgl. böhm. Ges. d. Wiss.
- WEISSMANN, A. (1877—1882): Beiträge zur Naturgeschichte der Daphnoiden. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 28—33.
- WILL, H. (1925): Reinzüchten von Hefen und anderen Sproßpilzen. ABDERHALDEN'S Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Abt. 12 T. 1.
- WINGARD, S. A. (1926): Studies of the pathogenicity, morphology and cytology of *Nematospora Phaseoli*. Bull. Torr. Bot. Club Vol. 52.

Tafelerklärung.

Tafel 3.

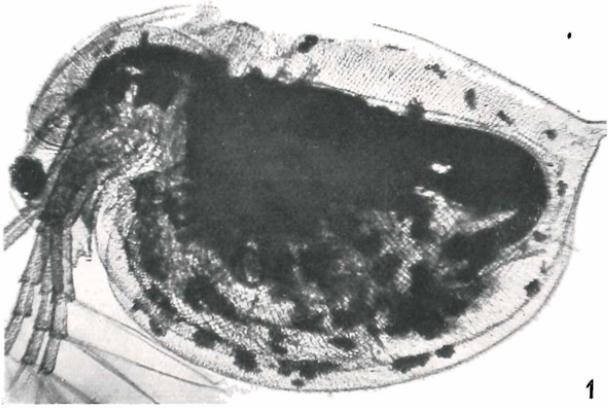
Fig. 1. Totalansicht einer befallenen Daphnie.

Fig. 2. Schnitt durch eine von der *Monospora bicuspidata* und der Daphnienhefe gleichzeitig befallene Daphnie. Tiefschwarz die Kolonie der Daphnienhefe, links oben in einer großen ovalen Kolonie die *Monospora*. Färbung: GRAM-Eosin.

Fig. 3. Schnitt durch ein befallenes Ovar. Färbung: Eisenhämatoxylin-Lichtgrün.

Fig. 4. Hefen beim Durchtritt durch die Darmwand. Färbung: Eisenhämatoxylin-Eosin.

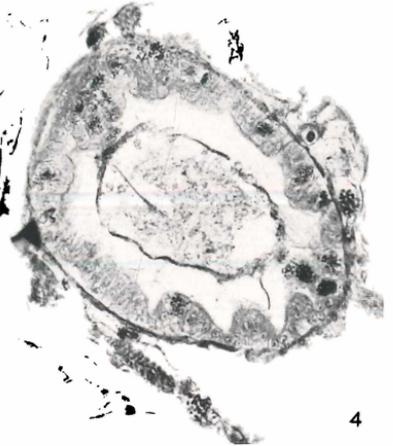
Fig. 5. Querschnitt durch eine Daphnie mit Ehippium. Die Kolonien der Hefe erscheinen tiefschwarz; links oben liegt eine Kolonie in der Schale des Ehippiums. Färbung: Eisenhämatoxylin-Eosin.



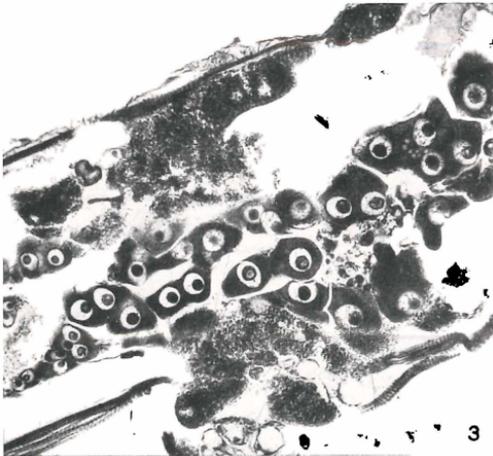
1



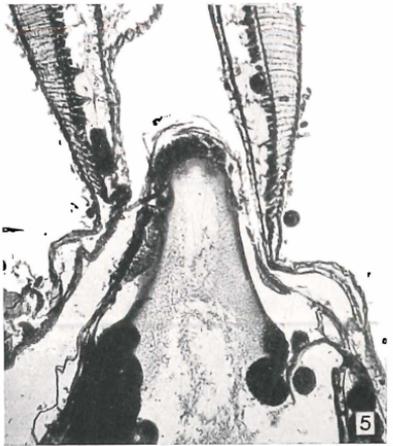
2



4



3



5

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1933

Band/Volume: [80_1933](#)

Autor(en)/Author(s): Rühberg W.

Artikel/Article: [Über eine Hefeinfektion bei Daphnia magna. 72-100](#)