

(Aus dem Zoologischen Institut der Deutschen Universität zu Prag.)

# Über den Einfluß der Stoffwechselendprodukte der Futterbakterien auf die Verdauungsvorgänge bei Protozoen (Untersuchungen an *Paramaecium caudatum* EHRBG.).

Von

**Hans Fortner** (Prag).

(Hierzu 1 Textfigur und Tafel 2.)

---

## Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung . . . . .	19
I. Problemstellung . . . . .	22
II. Methodisches . . . . .	24
III. Experimentelles . . . . .	29
IV. Diskussion . . . . .	45
Zusammenfassung . . . . .	52

---

Die Ernährungsphysiologie der Protozoen bot, seitdem man ihre Verwandtschaft mit der der höher organisierten Tiere erkannt hatte, eine Reihe reizvoller Probleme, die vor allem ihrer Zugänglichkeit wegen der berechtigten Hoffnung Raum gaben, von dieser Seite her in das funktionelle Getriebe des Zellorganismus, des Protoplasmas schlechthin, tieferen Einblick zu gewinnen.

Sobald die Forschung auf biologischem Gebiete die essentiellen Grunderkenntnisse über Analogie und Homologie aller Organisation gewonnen hatte und auf die Welt des Subvisibeln anzuwenden begann, war die Brücke zu einer rationellen Kategorisierung der vordem apokryphen und unzugänglichen Erscheinungen geschlagen.

EHRENBERG, STEIN und ENGELMANN sind die ersten Kolonisatoren jenes großen Gebietes und haben in umfassendem Stile Erkenntnisse und Erfahrungen über die Tiergruppe der Einzeller gesammelt. Viele der von ihnen beobachteten Dinge erfuhren freilich eine falsche Deutung, wie es heute unter Berücksichtigung des damals gegebenen Rüstzeuges in materieller und gedanklicher Hinsicht nicht weiter wundernehmen kann. Andererseits haben sich aber auch viele der seinerzeit gebildeten Urteile fast vollinhaltlich über den Zeitraum von mehr als einem halben Jahrhundert als richtig bewährt. Dies gilt vielleicht in erster Linie für die Bewertung von Zellgebilden, deren funktioneller Organcharakter sowohl durch ihre Beschaffenheit unmittelbar, als auch aus den sie betreffenden Wandlungen einzusehen war.

Gemäß unserem Programme sei darauf verwiesen, daß die Nahrungsvakuolen der Protozoen schon damals als ephemere Mägen bezeichnet wurden. Ein ebenso treffender wie humoristischer Terminus. Das Schicksal der in den Zellkörper aufgenommenen Nahrungspartikel wurde mit Hilfe der Vitalfärbung schon verhältnismäßig früh beobachtet und beschrieben (HOFER, ENGELMANN), und die Zahl der weiterhin in dieser Richtung angestellten Untersuchungen ist bis zu der klassischen Arbeit NIRENSTEIN'S (1905), die dem Problem auch im heutigen Sinne gerecht zu werden wußte, sehr groß.

Die Entwicklung der Lehre von den Fermenten seit BUCHNER'S bahnbrechenden Entdeckungen hat es nun mit sich gebracht, das Zellgeschehen, insbesondere dessen ernährungsphysiologische Seite ganz unter Gesichtspunkten zu betrachten, welche auf die Auffindung von spezifischen Biokatalysatoren abzielten (GREENWOOD, METSCHNIKOFF, HÖBER). Als dann in jüngster Zeit die  $p_H$  als Mensur für den Verlauf von fermentativen Prozessen in Schwung kam und die hierfür geeigneten Farbstoffindikatoren gefunden waren, erwies sich für weitere erfolgreiche Detailstudien bei den Protisten (BOZLER) in dieser Hinsicht der Weg geebnet. Als endgültiges Resultat dieser Untersuchungen kann unter anderen mit ziemlicher Sicherheit die Produktion einer freien Mineralsäure von nicht unerheblicher Konzentration (KALMUS, 1931 gibt eine solche bis  $p_H$  3,4—1,4! bei *Paramaecium* an) angeführt werden. Über den Zeitpunkt, in welchem die Verdauung der Nahrungselemente während deren Aufenthalt im Zellkörper erfolgt, gehen hingegen die Meinungen noch auseinander. Die Anwesenheit von Fermenten (Oxydasen) ist zwar schon für die Nahrungsvakuolen wahrscheinlich gemacht

worden (ROSKIN u. LEVINSOHN), die kurz nach ihrer Bildung untersucht wurden. Die eigentliche Aufspaltung der Nahrungsstoffe aber, vor allem der Eiweißsubstanzen, scheint erst bei später eintretender alkalischer Reaktion stattzufinden. Ein weiteres Rückgreifen auf diese Fragen scheint mir überflüssig, da dieselben grundsätzlich schon von NIRENSTEIN (l. c.) und von METALNIKOFF bearbeitet worden sind.

Hingegen blieben meines Wissens bei der Durcharbeitung dieses Gebietes eine Reihe von Gesichtspunkten unberücksichtigt, die ihres allgemein-biologischen Charakters wegen einiges Interesse verdienen.

Die Beziehungen zwischen Milieufaktoren und den Verdauungsprozessen bei den Protozoen stehen hierunter an erster Stelle.

Es repräsentiert einen augenfälligen Unterschied, ob wir danach fragen, was für Nahrung eine Löwe bevorzugt und welche Bakterien ein *Paramaecium* aus seiner Umgebung auswählt. Es ist nicht meine Absicht, das Gewicht dieser Antithese auf die Frage der Nahrungswahl in analytischem Sinne — welche Perzeptoren des Nahrungsaufnehmenden und welche Eigenschaften des Beutetieres maßgebend sind — zu verlegen. Dieses Problem stand schon auf dem Forschungsprogramm (BOZLER (1924)). Vielmehr erblicke ich den Angelpunkt der Angelegenheit in dem Unterschied, welchen die Nahrungsumwelt des Löwen und die des *Paramaeciums* in sich schließt.

Die Nahrungsquellen der Protozoen bilden die den Lebensraum ihres Milieus erfüllenden Bakterien. Diese bedeuten also für ihre Vertilger nicht nur die Beute, sondern auch einen Faktor, dessen Wirkungsäußerungen mit der Produktion von Stoffwechselendprodukten gegeben sind. Wie schon die Titelcharakteristik dieser Arbeit hervorhebt, soll es ihre besondere Aufgabe sein, die Wechselbeziehungen zwischen bakteriellen Abbauprodukten, welche durch den Begriff „Toxin“ näher umrissen werden, und den Fähigkeiten der Paramäcien, sich denselben anzupassen, des näheren zu erörtern. Da es sich hier vor allem um die Futterbakterien handeln wird, scheint mir der Ausdruck „Anpassung“ durchaus gerechtfertigt und heischt als Maßstab seiner Geltung unmittelbar die aus dieser Anpassung herausgebildeten Verdauungsprozesse.

Wie ich im Verlaufe der Untersuchungen darzutun hoffe, wird sich die Brauchbarkeit eines solchen Betrachtungsmodus erweisen

und soll gleichzeitig zeigen, daß es von Wichtigkeit ist, auch in der Biologie neben der Frage „Wie“ die Frage „Warum“ gelten zu lassen. Bei einer kritischen Grundeinstellung kann dies gar nicht zu abwegigen Introspektionen führen. Ich möchte sogar behaupten, daß die Frage „Warum“, bewußt gestellt, einem Einschleichen transzendentaler Deuteleien wirksam entgegensteht.

## I.

Schon im einleitenden Abschnitt wurde hervorgehoben, daß das Verdauungsproblem bei den Protozoen mehr als ein bloßes Fragen hinsichtlich der verschiedenen möglichen Verdauungsformen schlechthin ist. Da lebende Nahrung — im speziellen Falle Bakterien — aufgenommen wird, haben wir es mit weit verwickelteren Vorgängen zu tun als mit dem einfachen Töten lebender Substanz und einem fermentativen Aufschließen ihrer Bausteine.

Die Nahrungsquellen der hier besprochenen Protozoenform haben nicht nur als Baustoff- und Energielieferanten für dieselbe Bedeutung, sondern sind Umweltfaktoren in mannigfaltigstem Sinn. Die Vertilger der Bakterien stehen in engster Abhängigkeit von deren Stoffwechselprodukten und müssen innerhalb der in der Natur realisierten Milieucharaktere weitgehend an diese angepaßt sein. Ein Angepaßtsein an bakterielle Stoffwechselprodukte bedeutet aber nichts anderes als Immunität. Und eine solche müssen wir daher den bakterienfressenden Protozoen wohl zusprechen, wenngleich hier dieser Begriff einen anderen Umfang hat als in der serobiologischen Ideologie. Das, was hier eine an die Substratbeschaffenheit des Protoplasmas gebundene Eigenschaft ist, wird dort in eigene Sekrete — die Lymphe und das Serum — des vielzelligen Organismus verlegt, und nur im Falle der Leucocyten treten uns beide Modalitäten in Gestalt der Phagocytose entgegen. In der Tat ist das Vorhandensein von spezifisch auf die Leucocyten wirksamen Reizkörpern bakteriellen Ursprungs, z. B. der Bakteriotropine und Opsonine, ein Grund mehr, zwischen Verdauung und antigenen Fähigkeiten Beziehungen herzustellen und berechtigt, ganz besonders bei dem in Rede stehenden Problem, diesen Standpunkt einzunehmen.

Als Haupt- und Kardinalfrage werden wir demnach formulieren müssen:

Sind die bei der Verdauung von *Paramecium* sich abspielenden Vorgänge durch die Stoffwechselend-

produkte seiner Futtertiere, also Milieubakterien beeinflufbar?

Das Wie dieser Beeinflufbarkeit macht noch einige Erwägungen theoretischer Art notwendig, die wir in Kürze vornehmen wollen.

Unseren Vorstellungen gemäß muß also das Plasma der Paracien Stoffe bilden und enthalten, welche die ständig einwirkenden Toxine der Futterbakterien zu binden vermögen und sie als solche unwirksam machen. Die Toxine zerfallen nun prinzipiell in zwei Gruppen, von welchen die eine als Ectotoxin und milieuerfüllender Repräsentant der ständigen Einflußnahme auf die Zellen dem Endotoxin gegenüberzustellen sein wird, dessen Wirkung nur intravakuolär beim Aufschluß der dasselbe inkludierenden Bakterienprotoplasten zur Äußerung kommen kann.

Es ist nun anzunehmen, daß die Abwehrstoffe der Paracienzelle gegen Ecto- und Endotoxin seiner Futterbakterien im Entoplasma engstens beieinanderliegen, da Existenz und Ernährung im biologischen Sinne hier dasselbe bedeuten. Falls nun der postulierte Konnex dieser antitoxischen Fähigkeiten zu den Verdauungsvorgängen besteht, ist es wahrscheinlich, daß die der Verdauung dienenden Zellerivate, vor allem die acidophile Granula (NIRENSTEIN), in ihrer Wirksamkeit von den Toxinen betroffen werden. Es gilt daher zu untersuchen:

1. Ob und inwieweit die acidophilen Granula von den Bakterientoxinen gebunden werden.

2. In welcher Weise die acidophilen Granula ihre antibakteriellen Eigenschaften an den in die Nahrungsvakuole eingeschlossenen Bakterien zur Geltung kommen lassen.

Bezüglich des Verhaltens zur physiologischen Tönung der Paracienzelle und der verschiedenen sonstigen Eigenschaften der acidophilen Granula muß auf die Arbeit NIRENSTEIN'S (l. c.) und eigene Veröffentlichungen hierüber (FORTNER, 1926 u. 1928 a) verwiesen werden.

Die Sichtbarmachung der acidophilen Granula im Entoplasma *intra vitam* erfolgt am besten mit stark verdünnter Neutralrotlösung. Die Granula besitzen offenbar farbstoffspeichernde Fähigkeiten (Aviditäten) und verleihen dem Entoplasma des mit Farbstoff behandelten Tieres unter normalen Umständen den bekannten, diffus-kirschroten Farbton. Um vorwegzunehmen, in welcher Weise

sich die Wirkung von Bakterientoxinen auf die Paramäcienzelle bei oberflächlicher Betrachtung am augenfälligsten äußert, sei gesagt, daß sich Paramäcien, die mit Bakterientoxinen vorbehandelt wurden, nicht mit Neutralrot färben lassen, besser gesagt, nicht jene erwähnte diffuse Färbung annehmen. Für ein Eindringen des Farbstoffes legen gewisse sich färbende Einschlüsse (z. B. Ölkügelchen) Zeugnis ab.

Auch bezüglich des Gesamtverlaufes der Verdauung möchte ich auf die genannten Arbeiten verweisen, da eine abermalige Besprechung dieser Dinge den Raum- und Stoffverhältnissen unangemessen erscheint.

In Abschnitt III kommen ohnehin für das Vorliegende wesentliche Einzelheiten zur Sprache, so daß die Klarheit meiner Ausführungen dieser Unterlassung wegen nicht zu leiden braucht.

## II.

Es war naturgemäß von großer Wichtigkeit, das zur Untersuchung gelangende Material in bezug auf seine Wirkungsäußerungen und seine Beeinflußbarkeit so gleichmäßig als möglich zu halten. Um dies zu erreichen, mußten in erster Linie Kriterien gefunden werden, die einen halbwegs quantitativen Vergleich jener Eigenschaften zuließen, auf die es ankam.

Aus der Formulierung der gestellten Kernfrage geht hervor, daß vor allem darauf geachtet werden mußte, die der Wirkungsprüfung unterworfenen Bakterienextrakte aus dem Bakteriengemisch zu gewinnen, mit welchen die zu den Versuchen herangezogenen Paramäcien gefüttert wurden. Dies machte aber wiederum erforderlich — besonders im Hinblick auf die ungestörte Fortsetzung der Versuche — das Zuchtmaterial, sowohl der Bakterien als auch der Paramäcien, in seiner Herkunft und Zusammensetzung dem Vorangegangenen anzugleichen. Eine wesentliche Vereinfachung der Technik hätte es bedeutet, die Paramäcien einfach mit der Reinkultur irgendeines seiner bevorzugten Futterbakterien (meist GRAM-negative Formen) zu füttern, aber die diesbezüglichen Erfahrungen anderer Autoren (PHILIPS) sprachen zu sehr dagegen. Ferner mußte berücksichtigt werden, auf welchem Nährboden die Futterbakterien gezüchtet wurden, da sich herausstellte, daß dieser Umstand nicht gleichgültig für die untersuchten Phänomene war (vgl. weiter unten).

Unter Fortlassung der umfangreichen Versuche mag eine knappe Beschreibung der zu dieser Untersuchung in Anwendung gelangten

Methoden gegeben werden, da die Gültigkeit der aufgedeckten Beziehungen wohl z. T. strikte an die durch sie gewährleisteten Voraussetzungen gebunden sind.

---

Die gezüchteten Futterbakterienkulturen mußten einen doppelten Zweck erfüllen:

1. Als Nahrungsquelle für die Paramäcien,
2. Als Ausgangsmaterial für die Bakterientoxine.

Und zwar mußten, wie schon erwähnt, für beide Punkte jeweils dieselben Ausgangskulturen verwendet werden. Dies geschah auf folgendem Wege.

Auf 0,025 proz. fettfreier Fleischwasser-Peptonlösung  $\bar{a}\bar{a}$  wurden reine Stämme von *Bacillus proteus* und *Bacterium coli* geimpft, die von ebenfalls flüssigen Nährböden herstammten. In diese Kulturen kamen gewaschene Paramäcien (PAPPART) und fanden ein ihnen zusagendes Milieu vor, so daß sich ihre Teilungsrate bei einer Temperatur von 18—25° C in normalen Werten bewegte. Eine bakterielle Übervölkerung dieser Normalkultur mußte strengstens vermieden werden, um kontrollierbare Wechselwirkungen zwischen den von *Paramaecium* gebildeten Stoffwechselprodukten einerseits und den der Bakterien andererseits auszuschalten. Zu diesem Behufe wurden täglich orientierende Zählungen der Paramäcien sowie der Bakterien vorgenommen, die zu dem Ergebnis führten, daß ein Überimpfen in frische Kulturflüssigkeit ca. jeden fünften Tag notwendig war.

Das Weiterziehen der Kulturen wurde so bewerkstelligt, daß von eigens hierzu bestimmten Bakterienstammkulturen ausgehend zunächst eine bestimmte Anzahl Ösen derselben auf die 0,025 proz. Fleischwasser-Peptonlösung verimpft wurde und nach einer empirisch erprobten Zeitspanne dann ein konstantes Volumen der auffrischungsbedürftigen Paramäcienkultur hinzugefügt wurde. Diese Menge war im Vergleich zum neuen Kulturquantum als verschwindend zu bewerten, so daß nicht zu befürchten stand, nennenswerte Massen von Stoffwechselendprodukten mitzuziehen. Außerdem mußte sich ein derartiger Fehler ja beim jedesmaligen Weiterimpfen gleichbleiben und daher summarisch kompensieren. Damit war das Bedürfnis nach einem verlässlichen Versuchsmaterial hinsichtlich der Paramäcien befriedigt.

Zur Gewinnung von Massenkulturen des Futterbakterien-gemisches erwies sich folgende Methode als endgültig brauchbar.

Nachdem ein Versuch mit einer 3proz. Lösung des Fleischwasser-Peptongemisches fehlgeschlagen war, und zwar der elektiven Überwucherung von *Bacillus proteus* wegen, wurde das Bakterien-gemisch (aus den Paramäcienkulturen entnommen!) auf einer 5proz. Peptonlösung gezogen. Die mengenrelative Gleichgewichtslage der beiden kommensalen Bakterienformen *Bacillus proteus-Bacterium coli* blieb bis ins bakteriolytische Involutionsstadium leidlich gut erhalten, so daß diese Bedingung als erfüllt betrachtet werden durfte.

Das Bakterienwachstum wurde bei Zimmertemperatur bis zu maximaler Dichte (Kontrollzählungen) getrieben und die Kulturen dann verarbeitet.

Programmgemäß mußten drei verschiedene Wege zur Gewinnung der verschiedenen Toxine eingeschlagen werden:

1. Reines Ectotoxin = Toxin A <sup>1)</sup>.
2. Reines Endotoxin = Toxin B.
3. Das native Gemisch beider Toxine = Toxin (A.B).

Die Isolierung von Toxin A war verhältnismäßig einfach. Die eine maximale Populationsdichte aufweisende Kultur (Erstauftreten von Involutionsformen!) wurde einer fraktionierten Filtration unterworfen. Dies geschah aus zweierlei Gründen: 1. Um eine Beimengung von Toxin B zu vermeiden, die dann leicht zuwege kommt, wenn der bei sofortiger Verwendung feinstporiger Filter erforderliche Filterdruck zu einer Läsion der Bakterienprotoplasten führt und 2. um ein Abtöten der Kultur, sei es durch Hitze oder Toluol überhaupt zu umgehen. Als Filter kamen verschiedenporige Qualitäten von PASTEUR-CHAMBERLAND'schen Biskuitporzellan filtern und solchen nach NORDMEYER-BERKEFELD zum Gebrauch.

Das Filtrat wurde unter sterilen Kautelen in Einzelportionen von ca. 0,5 ccm in Ampullen aus SCHOTT-Gerätéglass eingeschmolzen, nachdem es vorher unter Durchleiten von reinem Stickstoff 1—2 Stunden bei einer Temperatur von 45° C gestanden hatte. Sterilisation bei Siedetemperatur und die Einwirkung von Sauerstoff verträgt Toxin A unter Beibehaltung seiner vollen Wirksamkeit nur kurze Zeit und dann nicht immer gleichmäßig. Dieser Umstand ist immerhin ein Hinweis darauf, daß wir es mit einem echten Ectotoxin zu tun haben. Das Toxin A wird ferner nach etwa 2-monatiger Aufbewahrung (im Licht) fast unwirksam; im Dunkeln hält es sich die doppelte Zeit, produziert dann aber einige Nebenwirkungen, die

<sup>1)</sup> Rein bezieht sich auf die Singularität von A oder B.

an frischem Filtrat nie beobachtet werden konnten. Ich möchte bemerken, daß dies nicht etwa auf eine infolge mangelhafter Sterilisation zurückgehende nachträgliche Veränderung der Toxine bzw. Toxoide zurückzuführen ist, da Plattenimpfproben nach beliebigen Intervallen negativ ausfielen.

Als sehr störend erwies sich ein leider nur schwer auszuschaltender Begleitstoff: Der Schwefelwasserstoff. Seine Bildung ist bei Anwendung von Pepton als Kulturmedium nicht zu unterdrücken. Es wurden deshalb, außer der Stickstoffspülung, noch andere Methoden erprobt, um ihn zu beseitigen. Die Fällung mit Bleisalzen hatte zwar den gewünschten Erfolg, aber schien mir zu unsicher und bedenklich, obwohl sich kein gelöstes Blei in den so behandelten Filtraten analytisch nachweisen ließ. Übrigens war der Wirkungseffekt der gleiche, wenn statt der Bleisalze Tierkohle oder Gur in frisch ausgeglühtem Zustand in die Filterkerzen eingetragen wurden. Der Wirkungsstandard der Toxinlösungen sinkt dann aber um etliches, weshalb die Methode der Stickstoffspülung beibehalten wurde.

Ferner wurde auch versucht, die Bakterien auf einem S-freien Nährboden zu züchten. In Anwendung kamen Lösungsgemische von Asparagin-Leucin, aber mit wenig Erfolg. Das Filtrat zeigte zwar eben noch die charakteristische Reaktion, war aber aus diesem Grunde zur Aufstellung einer Reaktionsnorm ungeeignet. Dieser Befund deckt sich übrigens mit den Resultaten von USCHINSKY, der fand, daß die Ectotoxinbildung auf eiweißfreien Substraten ganz allgemein eine schwächere ist.

Die Darstellung von reinem Toxin B war etwas umständlicher. Die Bakterienprotoplasten mußten möglichst gründlich abgeschlossen werden, um der Extraktion des Endotoxins keinen allzu großen Widerstand entgegenzusetzen. Auf den Weg der Glycerin- oder Salzplasmolyse mußte verzichtet werden, da diese Zusatzstoffe sich nachträglich nur schwer hätten entfernen lassen. Deshalb wurde ein mechanisches Aufschließen angewendet. Zu diesem Zwecke wurden die dichten Bakterienflocken in den Kulturen unter mehrmaligem gründlichen Waschen auf engmaschigen Stramminetzen gesammelt und mit der entsprechenden Menge Quarzsand versetzt. Das Gemisch erfuhr hierauf in einer Reibschale eine längerdauernde kräftige Bearbeitung und wurde schließlich unter nicht zu hohem Drucke in der Buchnerpresse entsäftet.

Auch der so gewonnene Extrakt erwies sich als thermolabil, wengleich stabiler als das Toxin A. Er konnte bei 80° C ohne

Wirkungseinbuße pasteurisiert werden und blieb in Ampullen zu 0,5 ccm-Dosen steril. Seine Haltbarkeit habe ich nicht näher untersucht, da er naturgemäß nur in kleinen Mengen zur Verfügung stand. Toxin B war frei von  $H_2S$ -Verunreinigungen.

Wie schon bemerkt, konnte Toxin (A B) nicht durch einfaches Mischen seiner beiden Anteile in irgendeinem Verhältnis hergestellt werden; es hätte sich so niemals die natürliche Relation von A und B reduzieren lassen. Daher wurde die ganze Bakterienkultur nach Vermahlen mit einer kleinen Menge Quarzsand, grobem Dekantieren und Filtrieren in einer geeigneten Kugelmühle einige Stunden lang durchgearbeitet. Die erhaltene milchigtrübe, äußerst widerwärtig riechende Flüssigkeit wurde, wie bei Toxin A, einer Filtration durch feinporige Kerzen unterworfen, mit sterilem Stickstoff durchspült und in der beschriebenen Weise in Ampullen abgefüllt.

Stichproben in kürzeren und längeren Intervallen (1—4 Wochen) ergaben ein genügendes Konstantbleiben des Wirkungsstandard, der an frisch hergestellten Mischextrakten kontrolliert wurde.

---

Nun noch einige Bemerkungen über die Art und Weise, auf welche die Wirkungsprüfung der Toxine, bzw. Toxingemische erfolgte.

Maßgebend für die Wirksamkeit des Toxingemisches Toxin (A B) sowie des Toxin (A) war das Behinderungsvermögen des Eintrittes der Vitalfärbung von *Paramaecium* in Neutralrotlösung 1:10000. Bezüglich der wesentlichen Einzelheiten des Manifestwerdens dieser Färbung verweise ich auf Abschnitt III dieser Arbeit. Der Test bestand darin, daß nach einer Kontrollfärbung der Kulturparamäcien solche durch 10 Min. in unverdünntes Toxin (A—(A B)) kamen, und dann in die Farbstofflösung übertragen wurden. Das Ausbleiben der diffusen entoplasmatischen Anfärbung wurde als Brauchbarkeitsmerkmal des Toxins angesehen.

Bei Toxin B mußte von einer derartigen Standardisierung abgesehen werden. Wie sich in III. und VI. zeigen wird, war sie bezüglich des in dieser Arbeit behandelten Fragenkomplexes zu entbehren. Daß sie aber für weitere Untersuchungen in dieser Richtung Interesse verdient, sei damit nicht gelegnet.

Natürlich wurden mit den sterilen Nährböden (5 Proz. Fleischwasser-Pepton) die entsprechenden Blindversuche angestellt,

um nicht etwa adsorptive Retentionsphänomene ihrerseits hinsichtlich des Testfarbstoffes außer acht zu lassen. Sie verliefen alle negativ, so daß von dieser Seite aus wohl keine Fehlergebnisse zu erwarten waren.

Zum Schluß wurden noch einige Proben bezüglich der Unschädlichkeit des verwendeten Vitalfarbstoffes Neutralrot auf die Paramäcien innerhalb der erforderlichen Grenze angestellt. Bei den unter III. erläuterten Inanitionsversuchen standen die Tiere nicht die gesamte Versuchszeit unter Farbstoffwirkung, sondern wurden derselben nur in Einzelfällen zur Feststellung des Digestionsverlaufes bzw. dessen phasischer Beschaffenheit ausgesetzt. Was sonst an allgemeiner Versuchstechnik in Betracht kam, wird bei der Erläuterung des einschlägigen Falles Erwähnung finden.

### III.

Um ein Bild darüber zu gewinnen, in welcher Weise die am Verdauungsvorgang beteiligten Zellelemente von *Paramaecium* unmittelbar auf die Stoffwechselendprodukte der Futterbakterien reagieren, wurden zunächst allgemein orientierende Versuche mit Toxin (AB) angestellt.

Die unter den beschriebenen Kautelen gehaltenen Paramäcien (II.) kamen in einem Tropfen der Original-Kulturflüssigkeit auf den Objektträger. Zu diesem waren ana aequales partes Toxin (AB) und das dasselbe produzierende Bakteriengemisch hinzugefügt (II.). Die Beobachtung ergab nun folgendes.

Nachdem die Individuen ihr Verhalten dem neuen Milieu angepaßt hatten, das heftige Hin- und Herschwimmen aufgehört und in einen normalen kompensatorischen Ortswechsel übergegangen war, begann bei zahlreichen Tieren das „Schlucken“. Ich verstehe darunter das mit meist schwachen Halbdrehungen des Körpers um seine Längsachse verbundene plötzlich einsetzende Abschnüren von einer oder oft einer ganzen Kette von Nahrungsvakuolen, die unter wirbelnder, seltener rutschender Bewegung in das entoperistomeale Plasma hineingerissen werden. Dabei geraten die im hinteren Körperabschnitt etwa schon vorhandenen Konkrementballen und Nahrungsinklude in eine ungerichtete rückende Verlagerung, die stark gedämpft zu sein scheint, da sich die Bewegungswelle nicht weiter fortpflanzt. Nach erfolgtem „Schlucken“, das nur sehr selten zusammenhängend länger als 2—3 Sekunden dauert, wechseln die Paramäcien fast immer den Weideplatz. Häufig treten sie längere

Reisen an, die den Anschein haben, als stünden sie unter dem Einfluß irgendeines endogenen Reizzustandes, ja wären durch ihn hervorgerufen. Andererseits haben aber diese Individuen auch die Tendenz, leicht thigmotaktisch zu werden. Diesem Umstand ist es zu verdanken, wenn man die, sich nach der Nahrungsaufnahme intrazellulär abspielenden Prozesse, besonders leicht und konsequent beobachten kann.

---

Es zeigt sich nun, daß die in Toxin (AB)-haltiger Kulturflüssigkeit gebildeten Nahrungsvakuolen sich in ihren Wandlungen wesentlich von den normalen Analogen unterscheiden. Nachdem sie sich völlig abgekugelt haben, tritt meistens eine Ruheperiode in ihrer cyclotischen Fortbewegung ein. Die von ihnen eingeschlossenen Bakterien erfüllen den zu Gebote stehenden Raum unter Beibehaltung der Beweglichkeit mit Ausnahme einer schmalen Randzone (wohl ein POISEUILLE'scher Raum). Die Vakuolenmembran erleidet im Gegensatz zu derjenigen normaler Tiere keine Veränderung bzw. Verdickung (vgl. FORTNER 1926). Unter nichtexperimentellen Bedingungen tritt nun beiläufig nach 10 Minuten ein Umschlag des Nahrungsvakuoleninhaltes zur sauren Reaktion ein. Hand in Hand damit verkleinert sich das Volumen der Vakuole und die von ihr eingeschlossenen Bakterien werden immobilisiert. Unmittelbar auf die Immobilisierung folgt nun ein Vorgang, der mir für die Art des Absterbens der Futterbakterien von großem diagnostischem Interesse scheint.

Simultan mit dem Sauerwerden und Schrumpfen des Vakuoleninhaltes beginnen die unbeweglich gewordenen Bakterien miteinander zu verkleben. Taf. 2 Fig. a—f zeigt die aufeinander folgenden typischen Phasen dieses Prozesses. Vergleicht man das Phänomen mit den bei der Serumwirkung auf Bakterien sich ergebenden Bildern, so erweckt es unmittelbar den Eindruck der Agglutination. Besonders auffällig ist hierbei, daß abgetötete und eventuell gefärbte Hefezellen bei Verfütterung unter sonst gleichen Umständen einer solchen nicht unterworfen sind, sondern vielmehr in äußerst losem Zusammenhang bleiben, wie man sich leicht durch Zerquetschen des *Paramaeciums* überzeugen kann. Dasselbe Resultat ergibt sich nun auch bei den mit Toxin (AB) behandelten Tieren. Hieraus muß geschlossen werden, daß der Vorgang des Verklebens von besonderen Wechselbeziehungen des aufgenommenen Futterobjektes und der

produzierten Sekrete abhängig ist. Verfolgt man das Schicksal der unter Toxin (AB)-Verfütterung gebildeten Nahrungsvakuolen eingehender, so werden die Voraussetzungen für diese Erscheinungen manifest.

Die Zeitspanne, innerhalb welcher sich der gesamte Verdauungsprozeß bei *Paramaecium* abwickelt, ist außer von der Temperatur von einer Reihe individueller Faktoren bedingt. Im Intervall von 18—22° C beträgt sie 2—4 Stunden und ist im allgemeinen bei der gleichen Individuallinie konstant. Am Ende der Verdauungsperiode haben sich die Nahrungsvakuolen unter Verdichtung durch Flüssigkeitsabgabe an das Entoplasma zu Fäcesballen konzentriert, deren Zusammensetzung je nach Qualität der Nahrung eine wechselnde ist. Bei reinem Bakterienfutter residuieren hauptsächlich öl- oder fettartige Tröpfchen, die oft von einer kompakten Hülle umschlossen sind. Vor der Ausstoßung durch den Cytoprokt vereinigen sich diese Konkreme häufig zu umfangreicheren zusammenhängenden „Kotplatten“, die mit ruckweisen Bewegungen ausgeschieden werden. Dieser Vorgang ist deshalb selten beobachtbar, da er sich mit großer Schnelligkeit und fast nur bei gleichzeitiger Bewegung des Tieres abspielt.

Es zeigte sich, daß bei den mit Bakteriensuspension-Toxin (AB) gefütterten Individuen eine Verdauung der aufgenommenen Bakterien überhaupt nicht eintritt.

Das Schicksal der Nahrungsvakuole ist von ihrer Bildung bis zu ihrer Ausscheidung außerordentlich einförmig. Der Umschlag in der ersten Phase des Verdauungsprozesses zur saueren Reaktion ist nur angedeutet, manchmal unterbleibt er ganz. Von einer Flüssigkeitsreduktion ist bis auf geringfügige Schwankungen die sich vielleicht aus der Deformierung der Nahrungsvakuole erklären, nichts zu bemerken. Die Bakterien bleiben beweglich und erfüllen bis auf jene Randdistanz den freien Raum der Vakuolenblase, ohne Rücksicht darauf, an welcher Stelle des Protoplasten sich diese auch befindet. Auffallend ist ferner, daß im perinukleären Abschnitt der Cyklosebahn ihre Wanderungsgeschwindigkeit keine Änderung erfährt, daß es zu keinen Stauungen im vorderen Ende des Körpers kommt, und daß ihre Ausscheidung ähnlich der einer pulsierenden Vakuole verläuft.

Die Dauer des Aufenthaltes einer solchen nicht verdauenden Nahrungsvakuole im Zellkörper ist kürzer als normalerweise. Da

das Durchlaufen der Cyclosebahn die reguläre Zeit in Anspruch nimmt, ist dies darauf zurückzuführen, daß die Zeit für die völlige „Trocknung“ des Vakuoleninhaltes in Fortfall kommt. Mitunter ist aber auch die Phase alkalischer Reaktion der normalen Verdauung nicht beobachtbar und in diesem Falle kann gelegentlich die Cyclose gänzlich unterbleiben. Das Individuum hat aber dann gewöhnlich nur 2—3 Nahrungsvakuolen „geschluckt“ und zeigt durch lebhaftes Hin- und Herschwimmen eine offenbar bis zu einem gewissen Grade mangelnde Milieueinstellung.

Um die beschriebenen Vorgänge einer genauen Analyse zu unterwerfen, wurden die Paramäcien mit Beibehaltung des Versuchsmodus zusätzlich mit stark verdünnten Neutralrotlösungen (1:10 000 bis 1:20 000) behandelt.

Wie seinerzeit (FORTNER, 1928 a) gezeigt werden konnte, färben sich im Entoplasma einer normalen Paramäcienzelle außer gewissen Öl- und Fetteinschlüssen die sog. acidophilen Granula. Morphologisch kaum einem bestimmten Typus von Zellerivaten zuzuordnen, bedingen diese Granula die diffuse Rotfärbung des Entoplasmas. Schon frühere Autoren verwiesen auf den ungleichen Ausfall dieser Färbung unter scheinbar völlig homologen Bedingungen; eine befriedigende Erklärung wurde nie abgegeben. Über den Relativgehalt des Plasmas an acidophilen Granula im Zusammenhang mit äußeren und inneren Stoffwechselbedingungen habe ich anderenorts berichtet (FORTNER, 1928 a). Allein auch daraus ging nicht durchsichtig genug hervor, warum besonders die Individuen bakteriell übervölkerter Paramäcienkulturen sich mit Neutralrot fast nicht färben lassen. Daß Permeabilitätsfragen hierbei eine Rolle spielen könnten, und zwar im Sinne einer Permeationsbehinderung durch den Ectosark, kommt dadurch in Fortfall, daß sich jene Fett- und Öleinschlüsse, sowie andeutungsweise auch die perinukleäre Zone, tingieren. Es muß also offenbar der Gehalt des Plasmas an farbstoffspeichernden Anteilen, eben den acidophilen Granula, eine Einbuße erlitten haben.

Bringen wir diese Tatsache mit den Ergebnissen der Toxin (AB)-Fütterung in Zusammenhang, so ergibt sich zunächst als Arbeitshypothese folgendes:

Die acidophilen Granula werden durch das Toxin (AB) in der Weise gebunden, daß sie sowohl ihre verdauenden Eigenschaften als auch die Fähigkeit der Farbstoffspeicherung verlieren.

Wenn wir nun unter diesem Gesichtspunkt die experimentelle Fragestellung formulieren, dann ergeben sich folgende näher zu untersuchende Teilprobleme <sup>1)</sup>).

A. 1. Worin äußern sich die verdauenden Fähigkeiten der acidophilen Granula.

2. Auf welchem Wege gelangt das Toxin (AB) in den Zellkörper.

3. Wird es daselbst gespeichert oder ausgeschieden.

Über die Art und Weise, in welcher die acidophilen Granula am Verdauungsvorgang beteiligt sind, haben zusammenfassend andere Autoren (NIRENSTEIN, 1905 und PROWAZEK, 1898) schon berichtet. Nach der von mir beobachteten Pseudoagglutination gewinnt nun die Frage einen Sinn, ob es möglich ist, differenzialdiagnostisch zu entscheiden, wodurch die in die Nahrungsvakuole eingeschlossenen Bakterien eigentlich getötet werden: Durch den Eintritt der sauern Reaktion oder durch die Substanz, welche die Agglutination der Bakterien herbeiführt.

Wie schon gesagt wurde, tritt bei den mit Toxin (AB)-Bakteriensuspension gefütterten Paramäcien weder Tötung noch Verdauung der gefressenen Nahrungsbakterien ein. Hingegen kann man, besonders bei Herabsetzung der Toxin (AB)-Dosen, den Eintritt der sauern Reaktion feststellen, ohne daß hierdurch eine Agglutination des Vakuoleninhaltes erfolgen würde. Die Bakterien verlieren zwar ihre Beweglichkeit, was aber noch kein Grund zu der Annahme ihres Absterbens ist. Denn bekanntermaßen hat die Geißel- und Cilienbewegung eine bestimmte  $p_H$  des umgebenden Mediums zur Voraussetzung. Diese, die Bewegung lähmende  $p_H$  muß aber noch nicht die sonstigen trophischen Funktionen des Bakterienprotoplasten aufheben. Die Immobilisierung der Bakterien erfolgt also wohl unter dem Einfluß des Sauerwerdens der Vakuole, aber das Verkleben derselben unterbleibt bei gleichzeitiger Gegenwart von Toxin (AB).

Dadurch wird es wahrscheinlich, daß die eigentliche Tötung der Nahrungsbakterien nicht durch die Säure, sondern durch einen mit den acidophilen Granula in Zusammenhang stehenden Stoff bewirkt wird.

<sup>1)</sup> Der Übersichtlichkeit halber wurden diese in drei Gruppen A, B und C zu je drei weiteren Einzelfragen zerlegt.

Aus diesem Grunde und auch vor allem deshalb, weil der die Bakterien agglutinierende Anteil der acidophilen Granula durch bakterielle Stoffwechselendprodukte (Toxin (AB)) unwirksam gemacht wird, möchte ich für die acidophilen Granula die passendere Bezeichnung **toxophile Granula**<sup>1)</sup> vorschlagen.

Die bis zur Ausscheidung fortgesetzte Beobachtung einer unter verdünnter Toxin (AB)-Wirkung stehenden Nahrungsvakuole rechtfertigt nun vollends den Schluß, daß nicht die Säurewirkung, sondern jener toxophile Anteil der toxophilen Granula ( $T_x$ ) die Tötung und Auflösung (Bakteriolyse) der Bakterien besorgt. Die nach dem Eintritt der sauren Phase immobilisierten Bakterien gewinnen in der zweiten Phase des Verdauungsvorganges, in der bekanntermaßen die alkalische Reaktion die saure ablöst, ihre volle Beweglichkeit wieder. Dies kann als Beweis dafür angesehen werden, daß den Verhältnissen tatsächlich der gemutmaßte Tatsachenbestand zugrunde liegt. Auch die oben angeführten Versuche mit Hefezellen sind hierfür eine weitere Stütze.

Um darüber entscheiden zu können, auf welchem Wege das Toxin (AB) in den Protoplasten der Paramäcienzelle gelangt, wurden folgende Experimente angestellt. A priori scheint es recht plausibel anzunehmen, daß das in Wirkung tretende Toxin (AB) einfach mit den cytopharyngeal eingestrudelten Bakterien in die Nahrungsvakuole aufgenommen wird und nun dortselbst die in der ersten Phase des Verdauungsprozesses eindringende  $T_x$  bindet, so daß diese für die Agglutination und Cytolyse ausgeschaltet werden. Folgende Überlegung macht aber diese Annahme einigermaßen unwahrscheinlich.

Beim Eindringen der  $T_x$  in die Nahrungsvakuole handelt es sich offenbar um einen Gleichgewichtsvorgang (FORTNER, 1926), dessen Verlauf darauf abzielt, die im Plasma stets vorhandene  $T_x$  (FORTNER, 1928 a) in die  $T_x$ -freien Nahrungsvakuolen hineinzubringen. Dieser Prozeß kommt nicht eher in Ruhelage, als bis eine Sättigung der Nahrungsvakuolen bzw. deren Membran (FORTNER, 1926) an  $T_x$  eingetreten ist. Diese Sättigung wird aber durch das innerhalb der Nahrungsvakuole wirkende Toxin (AB) aufgehoben und es müßte a conto

<sup>1)</sup> Die Bezeichnung „toxophile Granula“ liegt für gewisse Strukturelemente der Leucocyten schon in der Literatur vor (SAHLI). Ich möchte darauf hinweisen, daß der hier angewandte Terminus einen völlig anderen Begriffsinhalt umspannt, als der in der Hämatologie gebrauchte, der mehr den Charakter einer „Bezeichnung“ besitzt.

dessen sofort ein weiteres Nachdringen von  $T_x$  aus dem Entoplasma erfolgen. Dies ist nun aber anscheinend nicht der Fall.

Zunächst kamen solche mit Toxin (AB)-Bakteriensuspension und Neutralrotlösung gleichzeitig behandelten Individuen zur Untersuchung. Wie schon eingangs erwähnt, färbt sich bei in Toxin (AB) befindlichen Paramäcien mit Ausnahme von gewissen ergastischen Zelleinschlüssen überhaupt nichts. Das ist ein direkter Hinweis darauf, daß die  $T_x$  im gesamten Entoplasma vom Toxin (AB) gebunden wurde, aber auch darauf, daß letzteres durch Diffusion durch die freie Oberfläche des Protoplasten in denselben gelangt. Es lag mir nun daran, auch ohne Zuhilfenahme der Vitalfärbung diesen Tatbestand zu erweisen. Zu diesem Behufe brachte ich Paramäcien zuerst in Toxin (AB) und beließ sie darin solange, bis ich annehmen konnte, daß sämtliche  $T_x$  derselben inaktiviert waren. Darauf wurden die Individuen in Toxin (AB)-freie normale Futterbakteriensuspension übertragen und nun beobachtet, ob die typischen Verdauungsphasen nach der Bildung von Nahrungsvakuolen an denselben bemerkbar würden.

Es ergab sich, daß die nach der Übertragung in Toxin (AB)-freies Kultursubstrat entstandenen Nahrungsvakuolen sich analog denjenigen verhielten, die unter der simultanen Mitwirkung von Toxin (AB) gebildet worden waren.

Daraus geht hervor, daß nicht allein die durch die Nahrungsaufnahme unmittelbar invakuolierte Toxin (AB)-Menge den Verlauf der regulären Verdauung sistiert, sondern daß hierfür vor allem die generelle  $T_x$ -Bindung durch das in das Entoplasma des Individuums auf dem Wege der Diffusion gelangte Toxin (AB) verantwortlich zu machen ist. Daß es darin wirklich eine Inaktivierung der  $T_x$  bewirkt, erhellt sich aus den Tatsachen der Neutralrotfärbung. Weiterhin auch daraus, daß das durch die Inaktivierung entstandene Bindungsprodukt offenbar nicht dauernd im Zellkörper verbleibt, sondern ausgeschieden wird.

Hält man nämlich Paramäcien entsprechend lange nach deren Übertragung in reines Kulturmedium unter Kontrolle, so läßt sich beobachten, daß die darin zunächst verdauungsunfähigen Nahrungsvakuolen nach einer gewissen Zeit ihre Fähigkeit zur Verdauung wiedererlangen, und daß dann deren weiterer Verlauf ein durchaus normaler ist.

Da sich an dieses Ergebnis besonderes Interesse bezüglich der Entstehung der  $T_x$  knüpft, soll weiter unten, an dasselbe anschließend,

noch eingehend der damit zusammenhängende Fragenkomplex behandelt werden. Wenn wir die bisherigen Erfahrungen in bezug auf die gestellten Fragen noch einmal überblicken, läßt sich über die Bedeutung der  $T_x$  und des Toxin (AB) folgendes aussagen:

A. ad 1. Die bakteriolytischen Fähigkeiten der toxophilen Granula äußern sich in einer nach der Ansäuerung der Nahrungsvakuole einsetzenden Agglutination und teilweisen Auflösung der aufgenommenen Bakterien, womit auch die Bezeichnung toxophile Granula gerechtfertigt wird.

ad 2. Das Toxin (AB) gelangt sowohl auf dem Wege der Nahrungsaufnahme unmittelbar mit der eingestrudelten Vakuole als auch durch Diffusion in den Protoplasten von *Paramecium*.

ad 3. Nachdem das Toxin (AB) die  $T_x$  gebunden hat, wird es auf dem Wege des intermediären Abbaus aus dem Stoffwechselgetriebe entfernt und die Zelle erfährt hinsichtlich ihrer gestörten Funktionstüchtigkeit eine restitutio ad integrum.



Durch diese Feststellungen werden folgende Fragen experimentell zugänglich:

B. 1. Wo werden die toxophilen Granula im Zellkörper gebildet.

2. Was ist das Schicksal der toxophilen Granula.

3. Wie lange bedürfen die toxophilen Granula zu ihrer Genese.

Die mit Toxin (AB) 1—2 Stunden lang behandelten Paramäcien wurden in reines Kulturwasser + Neutralrotlösung 1 : 15 000  $\bar{a}\bar{a}$  übertragen. Wie zu erwarten war, blieb das Entoplasma der Individuen bis auf die obgenannten Einschlüsse ungefärbt; die  $T_x$  war vollkommen vernichtet.

Nach einer etwa 20 Minuten dauernden Erholung der Tiere im Toxin (AB)-freien Milieu trat in der unmittelbaren Umgebung des Macronucleus eine zarte, gegen das übrige Entoplasma scharf abgegrenzte sauerrot gefärbte Zone auf (vgl. Textfig. 1 a). Diese Zone liegt dem Ma zu Beginn ihres Erscheinens wie eine lose Kalotte auf, steht in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit der Kernmasse selbst und wird durch vorbeitreibende Nahrungsvakuolen nicht verzogen. Man gewinnt überhaupt den Eindruck,

daß das Entoplasma ein in sich versteiftes, elastisch-starres Medium ist, dessen bewegliche Anteile topographisch außerordentlich scharf gegen seine unbeweglichen, elastisch-stationären abgegrenzt sind.

Nach weiteren 30 Minuten hat die perinukleär gefärbte Zone an Breite und Tiefe gewonnen. Ihre Volumszunahme ist aber nicht mehr isotopisch gleichmäßig, sondern erstreckt sich besonders in den entoperistomealen Plasmabereich. Auf Textfig. 1 b ist ein mit dem Zeichenapparat gewonnenes Umrißbild dieses Stadiums wiedergegeben. Nach 1 Stunde erfüllen die  $T_x$  bereits das ganze Hinterende des Tieres ziemlich homogen. Merk-

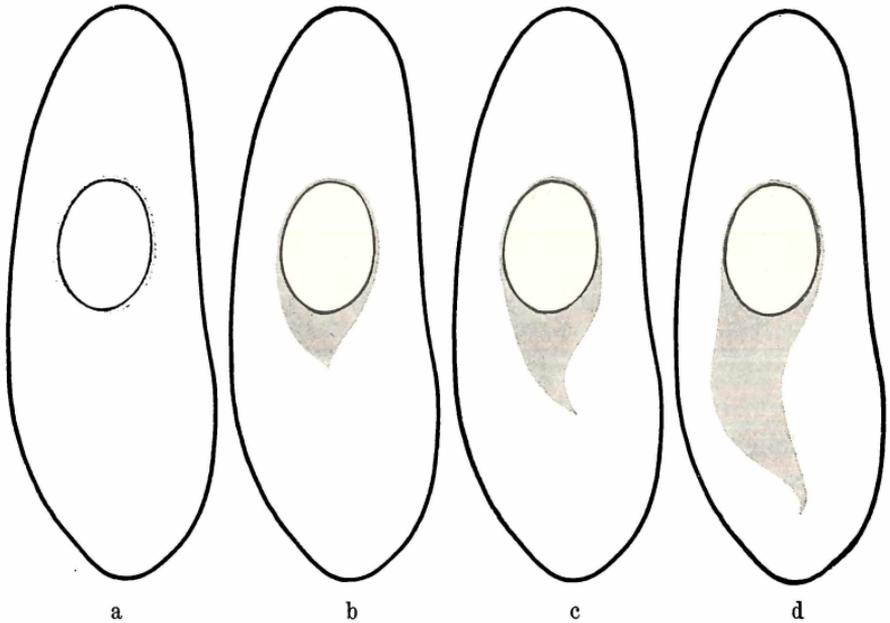


Fig. 1. a—d zeigt die Genese der toxophilen Granula bei mit Toxin (AB) entgranulierten Tieren. Das Stadium a ist etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden vor Stadium d. Die Abbildung ist stark schematisiert, aber den relativen Proportionen getreu wiedergegeben.

würdig ist, daß das Vorderende zunächst völlig freibleibt, d. h. die dort befindliche  $T_x$  nicht von der Ausbreitung der perinukleären Zone herrühren, sondern auf dem Wege der Cyclose offenbar von den Nahrungsbällen aus dem hinteren Körperabschnitt hingeführt werden. Die Ausbreitung der  $T_x$  ist also eine völlig unsymmetrische.

Die Zeitspanne, innerhalb welcher das gesamte Entoplasma von *Paramaecium* über den Normalgehalt an  $T_x$  verfügt, ist relativ schwankend. Quantitative Messungen wurden nicht ausgeführt, da diese auf Grund einer hierzu besonders geeigneten Methode einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben. Vergleicht man jedoch die

diffuse Färbungsintensität einer normalen Zelle mit derjenigen der zu beurteilenden, so läßt sich ein zunächst genügendes Urteil über „schon normal“ oder „noch nicht normal“ abgeben.

Nimmt man dieses Kriterium zu Hilfe, so ergibt sich für die Dauer der Wiederherstellung des Normalgehaltes des Entoplasmas an  $T_x$  eine Zeit von 2—8 Stunden.

Wie bemerkt, ist die Ausbreitung der neugebildeten  $T_x$  innerhalb des Protoplasten nicht gleichförmig, sondern ausgesprochen gegen den rückwärtigen Abschnitt der Zelle verschoben. Für eine homogene Verteilung sorgt dann die Cyclose, bei welcher durch die von ihr mitgeführten Nahrungskörper eine Art Durchmischung der vorderen und hinteren Entoplasmapartien zustande kommt.

Hieraus lassen sich auch zwanglos die relativ großen Unterschiede bezüglich des Eintritts einer gleichmäßigen Verteilung der  $T_x$  im Protoplasten erklären, da dann der momentane Ernährungszustand, d. h. die Zahl der vorhandenen Nahrungsvakuolen, eine erhebliche Rolle spielt.

Über das Schicksal der toxiphilen Granula habe ich anderenorts (FORTNER, 1928 a) Vermutungen ausgesprochen, die auch diesmal wieder bestätigt werden konnten. Beobachtet man nämlich Hungertiere, so sieht man, daß der Gehalt ihres Plasmas an  $T_x$  fortschreitend abnimmt, um noch vor dem Eintritt extremer Inanitionsphänomene, wie Vakuolisierung usw., einen konstanten verschwindenden Wert zu erreichen. Auch hier sind die individuellen Schwankungen in bezug auf die Dauer dieses Vorganges ziemlich groß, woraus geschlossen werden muß, daß ebenso wie bei der Restitution, auch die Reduktion der Einflußnahme des vorangehenden Ernährungszustandes unterworfen ist.

Die  $T_x$  verschwinden aus dem Entoplasma der Individuen, ohne daß Aussagen darüber möglich wären, in welcher Weise dieser Prozeß im Detail verläuft. Wahrscheinlich ist, daß eine intermediäre Aufspaltung der  $T_x$  erfolgt und die dabei resultierenden Trümmer erneut zu einer Resynthese der  $T_x$  unter Mitwirkung von Kernsekreten verwendet werden. Ich möchte hier nur darauf hinweisen, daß auch die Klärung dieser Frage bis zu einem gewissen Grade experimentell zugänglich ist. Werden nämlich Normal- und Hungerparamäcien mit Toxin (AB) behandelt, so muß sich aus der für beide Fälle ungleichen Restitutionsgeschwindigkeit zum Normalgehalt des Entoplasmas an  $T_x$  die Rolle ergeben, welche die toxingebundenen  $T_x$  bei der Resynthese derselben spielen.

Kurz resümiert kann folgendes zu den unter B gestellten Fragen bemerkt werden:

B. ad 1. Die toxophilen Granula werden in der unmittelbaren Umgebung des Macronucleus gebildet. Ihr erstbeobachtbares Auftreten ist perinukleär in Gestalt einer zarten Hülle, die in einem gewissen Abstand von der Kernmasse diese umschließt.

ad 2. Über das Vergehen der  $T_x$  können keine unmittelbaren Angaben gemacht werden. Doch hat es den Anschein, als ob die  $T_x$  auch im normalen Tier unter normalen Bedingungen einer kontinuierlichen Resorption unterworfen wären.

ad 3. Zu der endgültigen Wiederherstellung des Normalgehaltes des Entoplasmas an  $T_x$  bedarf es einer Zeitspanne von 2—8 Stunden. Der relativ große Spielraum kann durch wechselnde ernährungsphysiologische Voraussetzungen motiviert werden.

---

Es erübrigen sich nun noch Versuche unter folgendermaßen abgeänderten Bedingungen:

C. 1. Führt die Behandlung der Paramäcien mit Toxin (AB) bei entsprechender Dauer zur Inanition.

2. Läßt sich eine im Gang befindliche Verdauung durch Toxin (AB)-Einwirkung unterbrechen.

3. Von welchem Einfluß ist die Toxinkonzentration auf die untersuchten Phänomene.

Die bisher gewonnene Kasuistik läßt bereits eine Teilbeantwortung der unter C gestellten Fragen zu. Zusätzlich ergab sich unter ergänzenden Versuchbedingungen folgendes.

Wie unter A erörtert wurde, bindet das Toxin (AB) die im Zellleib von *Paramaecium* vorhandenen toxophilen Granula mit der Konsequenz, daß sowohl ihr Farbstoffspeicherungsvermögen — die Sichtbarkeit also — als auch ihre agglutinierenden und lytischen Fähigkeiten verloren gehen. Ob diese Art der Inaktivierung mit einer effektiven Vernichtung der korpuskularen Eigenschaften der  $T_x$  parallel läuft, konnte mit den zur Anwendung gelangten Versuchsmethoden nicht eruiert werden. Doch möchte ich immerhin bezweifeln, daß eine solche totale Vernichtung Hand in Hand mit dem Verschwinden der  $T_x$  geht. Vielmehr bin ich geneigt anzunehmen, daß es sich hier um Vorgänge handelt, die eine gewisse

Ähnlichkeit mit der Toxin-Antitoxinbindung haben. Als Ambozeptoren würden dann jene Anteile der  $T_x$  figurieren, die deren Neutralrotanfärbbarkeit bedingen. Da aber die Toxophilie jener haptophoren Gruppen größer ist als die Neigung zur Farbstoffspeicherung, so wird bei simultaner Wirkungskonkurrenz von Toxinfarbstoff dieses bevorzugt und der Tinktionseffekt bleibt aus.

Nun wäre jener Farbstoff-Toxin-bindenden haptophoren Gruppe der  $T_x$  auch die Fähigkeit, die Futterbakterien zu agglutinieren, zuzuschreiben, und zwar müßte konsequenterweise der ectotoxische Anteil des Toxin (AB) (= Toxin A) nur die Agglutination, nicht aber die Bakteriolyse verhindern.

Anders ist es mit jenem bakteriolytischen („verdauenden“) Anteil der  $T_x$  bestellt. Es läßt sich denken, daß bei der Toxin (AB)- $T_x$ -Koppelung dieser Anteil gar keine Inaktivierung erfährt, aber trotzdem nicht wirksam werden kann, da die in der Agglutination bestehende Vorbereitungswirkung — d. h. Tötung des Bakterienmaterials — ausbleibt. Andererseits kann man sich aber auch folgende Vorstellung bilden. Das im Toxin (AB)-Gemisch enthaltene Entotoxin (= Toxin B) muß zwar bakteriolytische Fähigkeiten besitzen, nicht aber agglutinieren. Da Endotoxine gegenüber Ectotoxinen erfahrungsgemäß (FRIEDBERGER-PFEIFFER, 1919) einen wesentlich geringeren Wirkungsgrad besitzen, wäre es denkbar, daß bei der nativen Relation von Toxin A zu Toxin B in Toxin (AB), Toxin B aus diesem Grunde überhaupt nicht wirksam wäre. Weiter unten soll noch einmal auf diese Frage zurückgegriffen werden. Man kann darüber zunächst denken, wie man will; sicher ist, daß die allfällige effektive Vernichtung der  $T_x$  auf die Beantwortung der gestellten Fragen keinen wesentlichen Einfluß hat.

Es ist also (vgl. S. 34) a priori zu erwarten, daß bei länger fortgesetzter Toxin (AB)-Behandlung die betreffenden Paramäcienzellen infolge ihrer Unfähigkeit, die aufgenommene Nahrung zu verarbeiten, mit der Zeit in einen Inanitionszustand geraten. Vorausgesetzt wäre hierbei, daß das Toxin (AB) außer seiner antigenbindenden Wirkung in sonst keiner Weise schädigenden Einfluß auf die Individuen hätte.

Daher wurden zunächst einige orientierende Versuche in dieser Richtung angestellt. Bei der originalen Toxinkonzentration ergaben sich in relativ kurzer Zeit verschiedenartige Schädigungen der Zelle, welche diese Versuchsmodifikation ausschlossen. Die Tiere begannen innerhalb von 24 Stunden Deformitäten aufzuweisen,

wurden ataktisch und lagen schließlich (nach spätestens 36 Stunden) regungslos am Boden des Versuchsgefäßes. In den meisten Fällen ließen sich diese Anzeichen einer beginnenden Allgemeinschädigung durch Übertragen in ein normales Milieu rückgängig machen, aber der zu erwartende Effekt der Inanition hätte sich dann nicht in unserem Sinne ableiten lassen.

Deshalb wurde die gegebene Ausgangskonzentration von Toxin (AB) mit der doppelten Menge destillierten Wassers verdünnt und so *ana partes* dem Kulturvolumen zugesetzt.

Die Neutralrotkontrolle ergab eine Bindung der  $T_x$  auch bei dieser Toxinkonzentration, so daß im weiteren Verlaufe mit den gleichen Voraussetzungen wie bei den früheren Experimenten gerechnet werden konnte.

Um die Ernährungsbedingungen bezüglich der Bakterienfutterdichte konstant zu halten, wurden die Tiere jeden Tag in eine frische Mischung verdünntes Toxin (AB)-Kulturwasser-Bakterien-suspension übertragen, die auf einen Konstantgehalt an den einzelnen Komponenten gestellt war (vgl. Methodisches, S. 25).

Außer dem Primäreffekt der Entgranulierung zeigten die Versuchstiere keinerlei Schädigungsmerkmale. Wie durch regelmäßige Kontrolle festgestellt werden konnte, erfolgte während der gesamten Versuchsdauer keine Verdauung in den gebildeten Nahrungsvakuolen.

Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden ziemlich regelmäßig Nahrungsvakuolen abgeschnürt; dann geschah das immer seltener, bis schließlich die Nahrungsaufnahme vollkommen sistierte. Die Individuen begannen allmählich Symptome einer sich einstellenden Inanition zu zeigen, die mit der Futtermangel-Inanition völlig übereinstimmte (vgl. WALLENGREEN). Nur die den Hungertieren sonst eigene Vergrößerung des Macronucleus trat nicht oder zumindest weniger auffallend in Erscheinung. Der Tod fand gewöhnlich zwischen dem 15. und 20. Tag Versuchsdauer unter allgemeinen Zeichen energetischer und substantieller Erschöpfung statt. Das grobvakuolisierte Plasma bekam einen eigentümlich opaken Glanz, die Tätigkeit der pulsierenden Vakuolen war infolgedessen nicht mehr feststellbar und die gelegentlichen Lokomotionsversuche verliefen ungerichtet und träge. In welchem Zeitpunkt des Versuches die durch die so erzeugte Inanition gesetzten Schädigungen noch reversibel waren, konnte nicht genau genug abgegrenzt werden, um über die, im Zusammenhang mit den

Kernprozessen Hand in Hand gehenden Abweichungen von einer normalen Inanition ein Urteil zu gewinnen.

Die zweite Frage betrifft die schon in die Nahrungsvakuolen eingedrungenen toxophilen Granula.

Wie festgestellt wurde ( $A_2$ ), gelangt das Toxin (AB) außer durch unmittelbare Invakuolisierung auf dem Wege der Diffusion durch freie Zelloberfläche in den Protoplasten. Um nun entscheiden zu können, ob die in Gang befindliche Verdauung durch einsetzendes Inwirkungtreten von Toxin (AB) beeinflußt werden kann, mußte festgestellt werden, inwieweit das Toxin (AB) imstande ist, in die Nahrungsvakuolen zu permeieren.

Es wurden also mit Nahrungsvakuolen reichlich beladene Individuen in eine Mischung von  $\bar{a}\bar{a}$  Toxin (AB)-bakterienfreies Kulturwasser gebracht und mit Neutralrotlösung von oben angeführter Konzentration behandelt.

Nun ergab sich, daß eine Beeinflussung der Verdauungsprozesse innerhalb der Nahrungsvakuolen durch Toxin (AB) von dem Phasenstand abhängig war, in welchem sich dieselben gerade befanden. Mit kurzen Worten: Nur die vor der ersten Phase stehenden Nahrungsvakuolen, also vor dem Einsetzen jeglicher Veränderungen überhaupt, waren einer Einwirkung durch das Toxin (AB) zugänglich. Dies kam in der schon genugsam bekannten Art und Weise zum Ausdruck; nämlich in einem Ausbleiben der agglutinierenden und auflösenden Wirkungsäußerungen der  $T_x$ . Alle übrigen Nahrungsvakuolen, in welchen die Verdauung schon in Gang war, verhielten sich gegenüber dem Toxin (AB) refraktär. Wenn ich hier anführe, eine Verzögerung des Digestionsprozesses in seiner Gesamtheit, besonders der „Trockenphase“ beobachtet zu haben, so fehlen mir die entsprechenden quantitativen Grundlagen, um dies stricte behaupten zu können.

Zu den unter C genannten Fragen bleibt noch zu ermitteln übrig, welchen Einfluß die relative Toxin (AB)-Konzentration auf die angeführten Vorgänge überhaupt nimmt. Das mit dem im methodischen Teil beschriebenen Herstellungsmodus gewonnene Toxin (AB) bezeichnen wir als Toxin (AB) I schlechthin und wählen es für die folgenden Versuchsbedingungen als Ausgangskonzentration oder größte Konzentration, mit welcher überhaupt experimentiert werden konnte. Die in folgender Tabelle angeführten Bruchwerte (nach steigenden Potenzen der Nennerbasis zwei geordnet) beziehen sich

auf die Verdünnungsrelation von Toxin (AB) I zu dem für die Verdünnung verwendeten filtrierten Kulturwasser in Volumteilen.

Tabelle 1.

Toxin (AB) I	Sauere Reaktion	Agglutination	Gehalt des Plasmas an T <sub>x</sub>
1/1	— (+)	—	∅
1/2	+ (—)	—	∅
1/4	+	—	∅
1/8	+	—	angedeutet
1/16	+	— (+)	"
1/32	+	+ (—)	"
1/64	+	+	fast normal

— bedeutet Ausbleiben, + Eintreten der namhaft gemachten Reaktionsweise.  
Der Gehalt des Plasmas an T<sub>x</sub> war ∅ nicht feststellbar.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, äußert sich die Wirkung des Toxin (AB) durchaus nicht homoförmig auf die einzelnen untersuchten Reaktionsweisen der Zelle. Hervorgehoben muß werden, daß die hier wiedergegebenen Feststellungen nur beiläufig gültig sind und eine quantitative Durchkontrollierung der diesbezüglichen Verhältnisse einer späteren Veröffentlichung mit präziserer Methodik vorbehalten bleiben. Dies führe ich hauptsächlich aus dem Grunde an, da es scheint, daß bei weiterer Verdünnung des Toxin (AB) wieder ein Wirksamkeitsbereich auftritt, dessen Konsequenzen für die normalen Kulturverhältnisse Bedeutung haben könnte, abgesehen von seinem theoretischen Interesse (ROBERTSON, PETERSEN).

Wir können also in Erledigung der Fragensgruppe C beifolgende Aussagen formulieren:

C. ad 1. Wird eine, die Paramäcienzelle nicht allgemein schädigende Konzentration von Toxin (AB) gewählt, die aber noch hinlangte, ihren Verdauungsvorgang zu sistieren, so gehen nach 15—20 Tagen die Versuchstiere an typischen Inanitionserscheinungen zugrunde. Gegenüber der Inanition, welche durch effektiven Nahrungsentzug hervorgerufen wird, und von einer Vergrößerung des Macronucleus begleitet ist, scheint sich der Ma unter den Toxin (AB)-Versuchsbedingungen nicht zu verändern.

ad 2. Eine schon in Gang befindliche intravakuoläre Verdauung kann durch Toxin (AB)-Einwirkung nicht mehr beeinflußt werden. Nur bei den Nahrungsvakuolen, die noch nicht in die erste (saure) Phase ein-

getreten sind, wird die Agglutination und somit die Abtötung der Bakterien sistiert.

ad 3. Der Einfluß der relativen Toxin (AB)-Konzentration differiert für die einzelnen Teilprozesse der Verdauung und den  $T_x$ -Gehalt des Entoplasmas in charakteristischer Weise. Die Agglutination wird noch in verhältnismäßig hoher Verdünnung gehemmt, während Säuerung und  $T_x$ -Gehalt nur von größeren Konzentrationen betroffen werden (vgl. Tabelle 1).

---

Bei allen Experimenten, über die im Vorangehenden berichtet wurde, handelte es sich um die Wirkung eines Toxingemisches. Das mit Toxin (AB) bezeichnete Substrat repräsentiert eine natürliche Kombination von Endo- und Ectotoxinen der Futterbakterien. Ob nun das wirksame Prinzip von Toxin (AB) im Endo- oder Ectotoxin oder in beiden zu suchen ist, konnten die Versuche aus diesem Grunde nicht entscheiden.

Obwohl es nicht in meiner Absicht liegt, den vorliegenden in sich geschlossenen Fragenkomplex durch eine systematische Untersuchung in dieser Richtung zu erweitern, so mögen doch noch einige allgemeine Orientierungsversuche bezüglich des aufgezeigten Problems angeführt werden.

Warum es von vornherein wahrscheinlicher ist, das den bakteriolytischen Anteil der  $T_x$  bindende toxische Prinzip im Endotoxin zu vermuten, darüber mag unter IV. (Diskussion der Ergebnisse) noch einiges gesagt sein (vgl. übrigens diesen Abschnitt S. 40). Hier ist lediglich der Tatbestand von Interesse. Über die Gewinnung von Toxin B (= Endotoxin) ist unter II. bereits berichtet worden.

Werden die Paramäcien unter sonst gleichen Versuchsbedingungen (vgl. eingangs II.) statt mit dem Toxingemisch (Toxin (AB)) nur mit Toxin A behandelt, so fällt zunächst auf, daß der Eintritt der sauren Reaktion der Nahrungsvakuolen in keiner Weise beeinträchtigt ist. Die Bakterien werden immobilisiert und bilden einen losen Ballen, der aber jedwedes Anzeichen einer Agglutination vermissen läßt. Die Cyclose verläuft ungestört und auch der Umschlag zur alkalischen Reaktion ist deutlich ausgeprägt. Die Bakterien erlangen in dieser ihre Beweglichkeit nicht wieder und scheinen sich zu regellosen Tröpfchen umzubilden. Die entoplasmatische Ent-

färbung des Tieres ist nicht so auffallend wie bei der Toxin (AB)-Einwirkung, doch immerhin noch so groß, daß eine Differenz gegenüber den mit Toxin (AB) behandelten Individuen wohl auffällt, wenn beide Versuche unmittelbar nebeneinander zur Anschauung gelangen.

Bei alleiniger Einwirkung von Toxin B zeigt sich keine Spur einer diffusen Färbung des Entoplasmas. Die erste Phase der Verdauung verläuft ohne den geringsten Farbumschlag. Dagegen werden die Bakterien mehr oder weniger vollkommen agglutiniert und erlangen, wie auch bei einseitiger Toxin A-Wirkung, ihre Beweglichkeit nicht wieder. Verdauung erfolgt nicht.

Es wird Sache der theoretischen Überlegungen sein, dieses verschiedenartige Verhalten von Toxin A und Toxin B, deren Auswirkungen auch summiert nicht den Toxin (AB)-Effekt geben, auf seine Ursachen und Konsequenzen hin zu prüfen. Um bündige Schlüsse daraus zu ziehen, ist die Zahl der in dieser Hinsicht angestellten Versuche zu gering.

#### IV.

In Sichtung der für die vorliegenden Probleme essentiellen Ergebnisse der experimentellen Bearbeitung sollen nur solche Tatsachen einer eingehenderen Diskussion unterworfen werden, die sich mit genügender Sicherheit haben erweisen lassen. Wie aus der Einleitung und der Problemstellung (II.) ersehen werden kann, haben sich sowohl die experimentellen als auch die einzelnen theoretischen Fragen aus einer allgemein biologischen Fragestellung heraus gebildet und selbst die differenzialdiagnostischen Wege sind diesem Grundsatz gefolgt. Es wird daher nicht notwendig sein, bei einer beziehungsvollen Darstellung und Verknüpfung der Einzel-tatsachen zu einer Gesamtheit andere als empirisch-biologische Bindemittel zu verwenden.

Vorausgeschickt mögen einige allgemeine Bemerkungen über Bakterienstoffwechselprodukte und den Begriff der Immunität werden. Da für unsere Fragen vor allem die Vorstellungen METSCHNIKOFF's und PPEIFFER's zuständig sind, lege ich diese dem Besprechenden zugrunde.

Die Bezeichnung der bakteriellen Stoffwechselprodukte als Toxine (Toxoide im weitesten Sinne) rührt von deren Wirkung auf den Organismus her. Nachdem man nämlich erkannt hatte, daß auch ohne Anwesenheit lebender oder toter Keime durch

Einverleibung dieser Körper die krankheitsspezifischen Symptome einer Vergiftung (Intoxikation) hervorgerufen werden. Man unterscheidet zwei große Gruppen von Toxinen: Die Ecto- und Endotoxine (PPEIFFER). Erstere sind die vom Bakterienorganismus produzierten Stoffwechselprodukte, die in den Lebensraum desselben abgeschieden werden. Sie stehen alsdann in keinem Zusammenhang mehr mit der produzierenden Zelle und können infolgedessen unabhängig von dieser ihre Wirkungen entfalten. Die Endotoxine sind Stoffe, die mit der Lebenstätigkeit der Bakterienzelle in anderer Weise in Verbindung stehen. Sie sind keine Exkrete, werden also nicht abgesondert, sondern finden sich im Entoplasma der Bakterienprotoplasten inkludiert und können demnach nur nach einer Zerstörung desselben, einer Bakteriolyse oder einem adäquaten Insult, zur Geltung kommen. Man könnte sie daher in gewissem Sinne als Inkrete auffassen, deren toxische Wirkung gegenüber der der Exkrete, der Ectotoxine, im allgemeinen eine weitaus geringere ist.

Gegen beide Gruppen von bakteriellen Stoffen reagiert der durch dieselben angegriffene lebende Organismus in ganz besonderer Weise. Der Effekt dieser Reaktion, sofern er zu einer Aufhebung der toxischen Eigenschaften jener Stoffe führt, bezeichnet man als Immunität. Es erübrigt sich, die allbekannten Vorstellungen EHRlich's und anderer in ihren vielfältigen Variationen und Modifikationen zu berühren.

Als zur Produktion gelangende Schutzstoffe sind bekannt die Antitoxine, die Bakterio- und Cytolysine, die Agglutinine, die Opsonine, die Bakteriotropine und die Präzipitine. Jeder derselben konnte in seinen Wirkungen und seinem Verhalten mehr oder weniger scharf von den übrigen gesondert werden. Die Charakteristik dieser Eigenschaften muß ich als bekannt voraussetzen und will gleich auf den uns speziell interessierenden Modus: Antitoxin-, Bakteriolyse- und Agglutininwirkung zurückgreifen.

Wir haben im experimentellen Teil (III.) unter Beantwortung der Fragen-Gruppe A die Ergebnisse hinsichtlich der Eigenschaften der toxophilen Granula einerseits und das Verhalten der Paramäcien gegenüber den Bakterientoxinen andererseits zusammengeschlossen. Wir sind dabei zu dem Schlusse gelangt, daß die toxophilen Granula in der sauren Phase des Verdauungsvorganges in die Nahrungsvakuole gelangen und dort an der Tötung, Ballung und Auflösung der Futterbakterien integrierenden Anteil nehmen.

Ob ihnen nebenbei auch verdauende, das ist abbauende Fähigkeiten zukommen, werden wir weiter unten untersuchen. Ferner zeigte es sich, daß die bakteriellen Stoffwechsellendprodukte auf dem Wege der Diffusion durch die freie Zelloberfläche der Paramäcienprotoplasten in deren Inneres gelangen und daß dieselben dort nicht verweilen, sondern nach einer Koppelung mit den toxophilen Granula mittelst intermediärer Prozesse in exzernierbare Stoffe umgewandelt, zur Ausscheidung kommen.

Die Funktion der toxophilen Granula läßt sich nach diesen Feststellungen zwanglos als die eines Agglutinins und Bakteriolytins auffassen, ohne daß eine spezifisch fermentative Komponente in Frage käme.

Wie wir fernerhin sahen, ist diese Stellungnahme besonders dadurch gerechtfertigt, als die toxophilen Granula mit einem Teil ihrer Wirkungen offenbar auf die Endotoxine der Futterbakterien gerichtet sein müssen, da sich diese erst bei einem Aufschließen der Bakterienprotoplasten innerhalb der Nahrungsvakuole äußern können. Es kann also gemäß dem PPEIFFER'schen Phänomen die Annahme einer notwendig antitoxischen Fähigkeit der toxophilen Granula überhaupt fortgelassen werden, ohne damit einer Erklärungsmöglichkeit für die manifestwerdenden Vorgänge zu entraten. Die toxophile Granula enthalten demnach Substanzen, die nicht einem notwendig vorangegangenen Immunisierungsprozeß entstammen, und welche doch die zu Nahrungszwecken aufgenommenen Bakterien töten und der fermentativen Aufspaltung ihrer Bausteine zuführen, sie bzw. hierfür geeignet machen.

In diesem Zusammenhange sei auf die METSCHNIKOFF'schen Anschauungen über Phagocytose verwiesen, die weitere Beziehungen zu den so deutbaren elementaren Fähigkeiten des Organismus, auf dem Umweg über eine Vorstufe — hier die Agglutination und Bakteriolyse — aus stoffwechsellendfeindlichen Organismen Nahrungsquellen zu erschließen, herstellen.

Was die saure Reaktion der Nahrungsvakuolen anlangt, wird diese durch die einwirkenden Bakterientoxine, besonders bei größerer Konzentration derselben, ebenfalls negativ beeinflusst, bzw. völlig unterdrückt. Über den Mechanismus der Bindung  $T_x$  — Toxin (AB) sagt diese Tatsache nur insofern etwas aus, als wir annehmen müssen, daß die Fähigkeiten der  $T_x$  — also Farbstoff-

speicherung und Toxinbindung — topisch eng beieinander liegen, bzw. einander unmittelbar beeinflussen. Es sei nur an die Grundlagen der EHRLICHschen Chemotherapie erinnert, um solche Möglichkeiten (Avidität — toxophore und ergophore Eigenschaften der Perzeptoren) in Betracht zu ziehen.

Daß eine Bindung der  $T_x$  durch das Toxin (AB) nicht nur innerhalb der Nahrungsvakuolen erfolgt, sagt uns die Nichtfärbbarkeit mit Toxin (AB) behandelter Paramäcien. Sie demonstriert auch gleichzeitig den Weg, auf welchem das Toxin in den Zellorganismus gelangt. Denn daß der Farbstoff tatsächlich in die Zelle eindringt, wird durch die sich färbenden anders gearteten entoplasmatischen Einschlüsse bewiesen, die die Vermutung hinfällig machen, daß etwa Permeationsbehinderung des Farbstoffindikators die Ursache der Ausfallerscheinung ist.

Was das Schicksal der toxinbeladenen toxophilen Granula betrifft, so können trotz mangelnder unmittelbarer Erfahrung in dieser Hinsicht doch einige ziemlich naheliegende Annahmen gemacht werden. Entweder wird im intermediären Stoffwechsel die haptophore Gruppe der  $T_x$  samt den daran hängenden Toxinanteilen abgetrennt und ausgeschieden und der Rest unter Mitwirkung gewisser, vom Großkern abgegebener Stoffe einer Resynthese zu aktivierter  $T_x$  unterworfen, oder es wird der ganze Toxin (AB)- $T_x$ -Komplex als Reststoff aufgespalten und abgebaut. Vielleicht lassen sich speziell hierüber in einer späteren Untersuchung stricktere Angaben machen, da, wie schon bemerkt wurde, ein hierzu geeigneter experimenteller Weg nicht unauffindbar erscheint.

Unter der Fragen- und Ergebnisgruppe B (III., S. 39) sind speziell die bildungsphysiologischen Probleme der  $T_x$  behandelt worden. Innerhalb der in der Natur und im Kulturexperiment von *Paramaecium* gegebenen bakteriellen Bedingungen läßt sich mit gewissen Schwankungen die  $T_x$  immer im Entoplasma der Individuen nachweisen. Wir haben eingangs (III.) erhoben, daß eine befriedigende Erklärung dieser Schwankungen bisher nicht gegeben werden konnte. Wie ich an anderer Stelle gezeigt habe (FORTNER, 1928 a), steht der Gehalt des Entoplasmas an  $T_x$  in nachweislichem Zusammenhang mit Hunger,  $O_2$ -Mangel, Kernreorganisationsprozessen und der Entwicklungsphase (innerhalb des Teilungsintervalls) der Tiere. Ich habe dort,

besonders was letztangeführte zwei Faktoren anlangt, auf meine Anschauungen über Entwicklungsintoxikation (FORTNER, 1928 b) verwiesen.

Doch diese Umstände bedingen niemals — wenigstens innerhalb der in Frage kommenden Grenzen — ein fast völliges Verschwinden der  $T_x$  aus dem Entoplasma der Versuchstiere, wie es speziell in bakteriell übervölkerten Kulturen oft nachweisbar ist.

Diese Schwankungen in der Färbbarkeit der Paramäcien lassen sich nun auf Grund unserer Ergebnisse zwangslos erklären:

Der größere oder geringere Gehalt einer Kultur an bakteriellen Stoffwechselprodukten bedingt die Menge gebundener  $T_x$  im Entoplasma der Individuen und somit ihre größere oder geringere Fähigkeit, den Farbstoff zu speichern.

Diese Tatsache wird durch das Verhalten von Paramäcien aus bakteriell übervölkerten Aufgüssen besonders illustrativ erwiesen.

Die Bildung der toxophilen Granula erfolgt im Entoplasma in unmittelbarer Umgebung des Großkernes. Ohne die trophischen Beziehungen und Wechselwirkungen desselben mit dem Protoplasma der Zelle einer Würdigung zu unterziehen (FORTNER, 1933), erhellt aus den experimentellen Tatsachen, daß der Ma auch hier in sekretorischer Hinsicht eine kardinale Rolle spielt. Welcher Art die Stoffe sind, in deren Anwesenheit erst im Entoplasma die toxophile Granula gebildet werden, entzieht sich zunächst völlig dem Urteil. Jedenfalls macht sich beim Fortschreiten dieser Bildung ein Gradient geltend, der die retronukleäre Region des Paramäcienprotoplasten als quasi nutritorische erscheinen läßt. Denn im entoperistomealen Abschnitt der Zelle liegt auch die Bahn der kleinen Cyclose (NIRENSTEIN) und die Anlage des Cytoprokt. Über die Phasen des  $T_x$ -Restitutionsvorganges vergleiche Textfig. 1. Inwieweit die Intensität einer Neubildung der  $T_x$  mit dem durch die Entwicklungsmomente veränderten allgemeinen Kerndynamismus zusammenhängt, ist nicht untersucht worden.

Zur Tatsachengruppe C (III, S. 43) haben wir noch einige wichtige Überlegungen hinzuzufügen. Ihr Aussageinhalt ad 1 bezieht sich auf die, durch konsequente Toxinbehandlung der Inanition verfallenen Paramäcien. Wir haben an dieser Stelle erkannt, daß die so produzierte Inanition zufolge der sistierten Fähigkeit, die aufgenommene Nahrung zu verwerten, zum letalen Ausgang führt.

Die Tatsache, daß den Tieren keine andersgeartete letale Schädigung als die erwähnte durch Dauereinwirkung der bakteriellen Stoffwechselprodukte zugefügt wird, rechtfertigt die in diesem Abschnitt unter Behandlung von A gezogene Konsequenz: Daß nämlich die Wirkung der bakteriellen Stoffe gar keine spezifisch toxische ist, sondern sich nur auf die Bindung mit Agglutininen und Bakteriolytinen — dem PPEIFFER'schen Phänomen gemäß — erstreckt. Dafür spricht weiterhin der in Tabelle 1 wiedergegebene Schädigungsgrad der einzelnen, der Gesamtwirkung subsummierten Teilprozesse. Wie ersichtlich ist, wird die Agglutinationsfähigkeit der  $T_x$  hinsichtlich der Futterbakterien noch von einer Toxinkonzentration betroffen, die für den Eintritt der sauren Phase sowie den sichtbaren Gehalt des Plasmas an  $T_x$  nicht mehr absolut ausschlaggebend ist.

Der Wirkungsmechanismus der toxophilen Granula läßt sich unter Zusammenschluß aller diesbezüglich gemachten experimentellen Erfahrungen folgendermaßen darstellen:

### Initialphase der Verdauung.

der Futterbakterien	}	Immobilisierung . Saurer	} Anteil der $T_x$
		Agglutination . . Ectoantitoxischer	
		Bakteriolyse . . Endoantitoxischer	

### Fermentative Phase der Verdauung.

Durch einen bei der alkalischen Reaktion in die Vakuole gelangenden Stoff.

Ferner unterscheidet sich der durch Toxinverabreichung hervorgerufene Inanitionszustand der Paramäcien noch dadurch von einem durch Nahrungsentzug erzeugtem, daß im Gegensatz zu letzterem der Kern keine relative Vergrößerung erfährt (CHEJFEC). Vielleicht ist dies mit der  $T_x$ -produzierenden Fähigkeit des Macronucleus verknüpft, und zwar etwa in der Weise, daß die Toxeinwirkung durch die Bindung der  $T_x$  diese Fähigkeiten des Maderart erschöpft, daß es zu einer Reduktion seiner trophisch-sezernierenden Masse kommt. Dafür spricht auch, daß im Falle normalen Hungerns die  $T_x$  zwar auch bezüglich ihrer Menge im Entoplasma eine Minderung erfährt (FORTNER), aber nicht infolge eines ständig wirkenden Reizes nachproduziert werden muß. Denn wahrscheinlich ist es so, daß die Inanition auch die  $T_x$ -Vehikel-

substanz angreift und im Normalfalle zu einer Verminderung derselben führt.

Daß sich die Toxinwirkung nicht auf einen schon in Gang befindlichen Vakuolenprozeß erstreckt, gibt uns die Grundlage zu einer zweifachen Folgerung.

Erstens ist damit bewiesen, daß die  $T_x$  Fermente nur in unwesentlichen Mengen enthalten kann und daß diese in der Hauptsache offenbar erst später in die Vakuole hineingelangen. Denn sobald die  $T_x$  die in die Vakuole aufgenommenen Bakterien agglutiniert und aufgelöst hat (besser: „angelöst“ hat), ist ein Hinzukommen weiterer Toxine belanglos und demgemäß das, was sich dann abspielt, nicht mehr mit Toxin-Antitoxinbindung in Zusammenhang zu bringen.

Daß die Toxine auch in die Nahrungsvakuole hineingelangen, ergibt sich daraus, daß vor dem Eintritt der Agglutination und Bakteriolyse in der fertigen Nahrungsvakuole durch Toxinbehandlung ein solcher verhindert wird.

---

Wenn wir schließlich unter Berücksichtigung aller Tatsachen das bearbeitete Gebiet zusammenfassend überblicken, so läßt sich das mit knappen Worten unter Fortlassung aller Einzelerkenntnisse, die in einer eigenen Zusammenfassung gewürdigt werden, in folgenden Rahmen fassen:

*Paramaecium* besitzt die Fähigkeit, die Stoffwechselprodukte seiner ihm gleichzeitig als Nahrung dienenden Milieubakterien in den in Betracht kommenden Konzentrationen unschädlich zu machen. Dies geschieht mit Hilfe von im Entoplasma unter der Mitwirkung des Großkernes gebildeten Stoffen, den **toxophilen Granula**, die auch an der Initialphase der Verdauung der aufgenommenen Bakterien beteiligt sind. Es kann der Vorverdauungsvorgang selbst als eine echte Phagocytose (METSCHNIKOFF) angesehen werden, deren charakteristisches Hauptmerkmal in der Produktion von **agglutinierend** und **bakteriolytisch** wirkenden Substanzen besteht. Deren Einwirkung werden die aufgenommenen Bakterien vor dem eigentlichen fermentativen Abbau unterworfen, der nicht bei der sauern Reaktion des Vakuoleninhaltes vor sich geht,

sondern erst in der alkalischen Periode des Cycloseverlaufes erfolgt und in der Hauptsache proteolytisches Gepräge trägt. Von einer Immunität der Paramäcien in des Begriffes herkömmlichem Umfang kann nicht gesprochen werden, da die Spezifität einer solchen mangelt. Die Bakterientoxine, welche in ihrem Gesamtverhalten die Paramäcienzelle nicht toxisch beeinflussen, werden nur ihrer Einflußnahme auf die, zur Vorverdauung der gefressenen Bakterien nötigen Agglutinine und Bakteriolyse beraubt. Dies erfolgt durch die toxophilen Granula, dieselben Stoffe, welche die Vorbereitung der Nahrung innerhalb der Nahrungsvakuole zu deren Abbaubarkeit besorgen.

Hierdurch scheinen immunbiologische Beziehungen zwischen ein- und vielzelligen Organismen im Sinne einer Anpassung an milieubedingte Faktoren hergestellt zu sein.

---

Daß sich solche Beziehungen auch bei anderen Protistenformen werden erweisen lassen, ist auf Grund einiger eigener Erfahrungen orientierenden Charakters sehr wahrscheinlich. Die reizvolle Aufgabe weiterer Untersuchungen in dieser Richtung wird es sein, festzustellen, ob Zusammenhänge mit der Beschaffenheit des Biotops hinsichtlich seiner bakteriellen Siedler und der heterotrophen Einzeller desselben bestehen. Es ist wohl möglich, daß sich dann eine Artspezifität jener giftbindenden Plasmaabkömmlinge herausstellt und so einen kleinen Beitrag zur Vervollständigung unserer noch sehr lückenhaften Vorstellungen über das Milieu und dessen Feinstruktur liefert.

Mit Absicht blieben eine Reihe von unmittelbar sich eröffnenden Versuchswegen unbeschritten, da neue Erfahrungen und Beziehungen immer eine, im Verhältnis hierzu, potenzierte Summe von experimenteller Beweiskraft erfordern.

### **Zusammenfassung.**

I. Die 1. (sauere) Phase des intravakuolären Verdauungsprozesses bei *Paramaecium caudatum* repräsentiert eine Vorbereitung der aufgenommenen Bakterien zum fermentativen Abbau.

II. Erst in der 2. (alkalischen) Phase findet eine Verdauung, d. h. Umwandlung in lösliche und resorbierbare Stoffe, der aufgenommenen Bakterien statt.

III. Wird der reguläre, d. h. vorbereitende Verlauf der 1. Phase des intravakuolären Verdauungsprozesses gestört, so tritt keine fermentative Aufspaltung in der 2. Phase ein.

### A.

1. Die von den Nahrungsvakuolen umschlossenen Bakterien werden nicht von der saueren Reaktion ihrer Sekrete getötet, sondern von einem, mit den **toxophilen Granula** (= acidophile Granula) gekoppeltem Stoffe, der mit dem Eintritt der saueren Phase in die Nahrungsvakuolen abgeschieden wird.

2. Das Bild des Absterbens der in der Nahrungsvakuole befindlichen Bakterien gleicht in seinen wesentlichen Zügen dem Vorgang einer Agglutination.

3. Erst nach dem vollständigen Eindringen der toxophilen Granula in die Nahrungsvakuolen werden die Bakterien darin agglutiniert.

4. Wird mit den Bakterien gleichzeitig ein natives Gemisch von Ento- und Ektotoxinen derselben (Toxin (AB)) an die Paramäcien verfüttert, so überleben die Bakterien die saure Phase der Verdauung und bleiben bei entsprechender Toxin (AB)-Konzentration während der ganzen Dauer ihres Aufenthaltes in der Nahrungsvakuole am Leben und werden lebend ausgeschieden.

5. Durch entsprechend langes Behandeln mit Toxin (AB) von geeigneter Konzentration lassen sich an den Paramäcienzellen typische Inanitionserscheinungen hervorrufen, die mit deren Unfähigkeit, die Nahrung auszuwerten, zu erklären sind.

6. Die Nahrungsaufnahme selbst wird bei in verdünntem Toxin (AB) befindlichen Paramäcien erst nach längerer Einwirkungsdauer desselben beeinträchtigt. Innerhalb einer kürzeren Zeitspanne werden Nahrungsvakuolen mit normalem Inhalt vom Cytopharynx abgeschnürt.

### B.

1. Die im Entoplasma der Paramäcienzelle diffus verteilten toxophilen Granula werden durch Einwirkung von Toxin (AB) innerhalb eines Zeitraums von

5 bis 10 Minuten ihrer Eigenschaft, Neutralrot zu kumulieren, beraubt.

2. Der Nachweis dieser Tatsache erfolgt mit Hilfe hochverdünnter Neutralrotlösung, die von den Kontrolltieren ohne Schädigung vertragen wird. Das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle wird dadurch bewiesen, daß sich wohl Fettkügelchen und Öltröpfchen im Entoplasma anfärben, nicht aber Granula.

3. Die Produktionsstätten der toxophilen Granula sind im Entoplasmabereich unmittelbar um den Kern herum zu suchen (vgl. Textfig. 1).

4. Eine entgranulierte Paramäcienzelle bedarf einer Zeitspanne von 2—8 Stunden, um ihr Entoplasma auf seinen Normalgehalt an toxophilen Granula zu bringen.

5. Die Wirkung der toxophilen Granula von *Paramäcium* auf verschiedene Futterbakterien (gramnegativ!) scheint eine unspezifische zu sein.

Es besteht ein noch näher zu prüfender Unterschied in der Wirkung von Ento- und Ektotoxinen der Futterbakterien auf die Bindung der toxophilen Granula.

### C.

1. Der reguläre Verlauf der 2. (alkalischen) Phase der intravakuolären Verdauung wird unter dem Einfluß von Toxin (AB) gestört.

2. Bei entsprechender Konzentration des Toxin (AB) unterbleibt der Eintritt der alkalischen Reaktion sowie die damit Hand in Hand gehende Hofbildung.

3. Das vor der Ausscheidung der unverdaulichen Reste sich unter Flüssigkeitsrestrinktion bildende Fäceskonkrement ist lockerer und wasserreicher als normalerweise.

4. Unter dem Einfluß von Toxin (AB) verbleiben ferner die aufgenommenen Nahrungsstoffe nicht so lange im Zellkörper, als dies beim Eintreten des Verdauungsprozesses der Fall ist.

5. Resorption irgendwelcher Anteile aus den unter Toxin (AB)-Einwirkung gebildeten Nahrungsvakuolen in das Entoplasma der Paramäcienzelle konnte niemals beobachtet werden. Ausgenommen sind kleine Schwankungen vor dem Eintritt der Defäkation.

6. Die Cyclose selbst war in keinem Falle bei der Futterbakterien-Toxin (AB)-Verfütterung auffallend gestört. Kleine Unregelmäßigkeiten derselben konnten mit dem Allgemeinzustand des Zellindividuums in Zusammenhang gebracht werden.

### Literaturverzeichnis.

- BOZLER, E. (1924): Über die Morphologie der Ernährungsorganelle und die Physiologie der Nahrungsaufnahme bei *P. caudatum*. Arch. f. Protistenk. Bd 49.
- BRAUN, H. (1931): Allgemeines über den Verwendungsstoffwechsel krankheits-erregender Bakterien. Die Naturwissenschaften Jahrg. 19 H. 20.
- BRETSCHNEIDER, L. H. u. HIRSCH, G. CHR. (1927): Nahrungsaufnahme, intraplasmatische Verdauung und Ausscheidung bei *Balantidium giganteum*. Zeitschr. f. wiss. Biol. Abt. C: Zeitschr. f. vergl. Physiol. Bd. 6 H. 3/4.
- DOGIEL, V. (1929): Experimente über die Ernährungsphysiologie der Infusorien. Kongreß d. Int. Zool. Budapest.
- DOGIEL, V. u. ISSAKOVA (1927): Physiologische Studien an Infusorien. 2. Der Einfluß der Salzlösungen auf die Ernährung von *Paramecium*. Biol. Zentralbl. Bd. 47.
- FIVEISKAJA, A. (1929): Einfluß der Kernparasiten der Infusorien auf den Stoffwechsel. Arch. f. Protistenk. Bd. 65.
- FORTNER, H. (1926): Zur Frage der diskontinuierlichen Exkretion bei Protisten. Arch. f. Protistenk. Bd. 56.
- (1928a): Zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge bei Protisten. Studie an *P. caudatum*. Ibid. Bd. 61.
- (1928b): Das Intoxikationstheorem. Protoplasma Bd. 3.
- (1933): Die funktionelle Teilungsphase der Zelle. I. Teil. Biologia Generalis Bd. 9.
- FRIEDBERGER-PFEIFFER (1919): Lehrbuch der Mikrobiologie. Jena.
- GREENWOOD, M. (1894): On the constitution and mode of formation of „food vacuole“ in infusorie etc. Transact. Royal Soc. of London Vol. 185.
- HOFER, BRUNO (1869): Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Kernes auf das Protoplasma. Jenaische Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24.
- HÖBER, R. (1926): Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 6. Aufl. Leipzig.
- KALMUS, H. (1931): *Paramecium*. Jena.
- MASUGI, MATAZO (1928): Über die Wirkung des Normal- sowie des spezifischen Immunserums auf die Paramácien. Über die Immunität derselben gegen die beiden Serumwirkungen. Krankheitsforschung Bd. 5.
- METALNIKOFF, S. (1904): Über die intracelluläre Verdauung. Bull. Ac. Sc. Petersburg T. 19.
- (1907): Über die Ernährung der Infusorien und deren Fähigkeit, ihre Nahrung zu wählen. (Vorl. Mitt.) Trav. Soc. Nat. Petersburg Vol. 38 Prot.
- NIRENSTEIN, E. (1905): Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 5.

- PAPPART, A. (1924): The bacteriological sterilization of Paramecium. Biol. Bull. Mar. biol. Labor. Wood's hole Vol. 55.
- PROWAZEK, S. (1898): Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 63.
- RAKIETEN, MORRIS, L. (1928): Effect of seriological systems on paramecium. Journ. of Immun. Vol. 15.
- ROSKIN, GR. u. LEVINSOHN, L. (1926): Die Oxydasen und Peroxydasen bei Protozoa. Arch. f. Protistenk. Bd. 56 H. 2.
- (1926): Die oxydierenden Fermente der Protozoen. Trudy mikrobiologičeskogo naučno-issledovatel'skogo instituta Bd. 2 (russisch).
- RUMJANTZEW, A. u. KEDROWSKY, B. (1927): Untersuchungen über Vitalfärbung einiger Protisten. Hydrobiol. Stat. am See Glubokoje, Moskau. Proto-plasma Bd. 1 H. 2.
- TOBLER, FR. (1931): Untersuchungen und Betrachtungen über Immunität und Immunisierung im Pflanzenreich. Die Naturwissenschaften Jahrg. 19 H. 20.
- TUNNICLIFF, RUTH (1928): Use of paramecia for studying toxins and antitoxins (measles scarlet fever and diphtheria). Phoc. Soc. exper. Biol. a. Med. Vol. 26.
- VOLKONSKY, M. (1929): Les Phénomens cytologiques au cours de la digestion intracellulaire de quelques cilies. C. R. Soc. Biol. T. 101.
- WALLENNGREN, H. F. S. (1902): Inanitionserscheinungen der Zelle. Untersuchungen an Protozoen. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 1.

---

### Tafelerklärung.

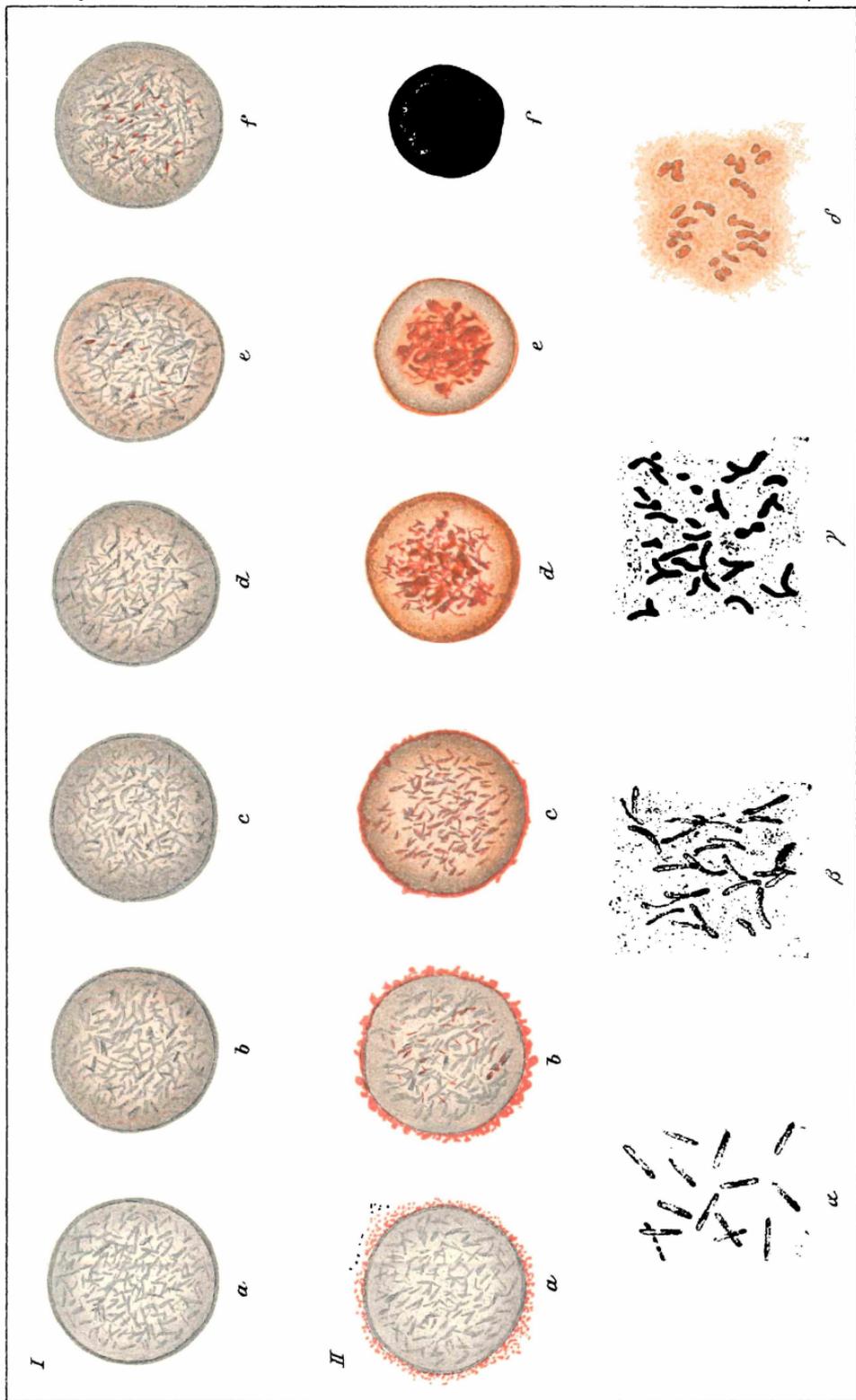
#### Tafel 2.

Fig. 1 a—f zeigt eine Nahrungsvakuole bei simultaner Toxin (AB)-Bakterien-suspensionfütterung; bei c ist eine Andeutung der saueren Färbung eben wahrnehmbar; bei f haben sich einige Körperchen im Innern der Vakuole angefärbt; die Bakterien sind farblos und nicht agglutiniert. (Apochr. Imm. 90, Comp. Oc. 10.)

Fig. 2 a—f repräsentiert das Schicksal einer normalen Nahrungsvakuole in der saueren Phase des Verdauungsvorganges. Die einzelnen Stadien (a—f) entsprechen denjenigen der unter 1 abgebildeten Vakuolen. (Apochr. Imm. 90, Comp. Oc. 10.)

$\alpha$ — $\delta$  zeigt die Agglutination und Bakteriolyse der in die Nahrungsvakuole eingeschlossenen Futterbakterien bei stärkster Vergrößerung. (Imm. 100, Periplanat. Oc. 25.)  $\alpha$  entspricht a (2),  $\beta$  etwa c (2) und  $\delta$  dem Stadium e (2).

---



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1934

Band/Volume: [81\\_1934](#)

Autor(en)/Author(s): Fortner Hans

Artikel/Article: [Über den Einfluß der Stoffwechselendprodukte der Futterbakterien auf die Verdauungsvorgänge bei Protozoen \(Untersuchungen an Paramecium caudatum Ehrbg.\). 19-56](#)