Biologisches Centralblatt.

Begründet von J. Rosenthal.

In Vertretung geleitet durch

Prof. Dr. Werner Rosenthal

Priv.-Doz. für Bakteriologie und Immunitätslehre in Göttingen.

Herausgegeben von

Dr. K. Goebel und **Dr. R. Hertwig**

Professor der Botanik — Professor der Zoologie

in München

Verlag von Georg Thieme in Leipzig

Der Abonnementspreis für 12 Hefte beträgt 20 Mark jährlich.
Zu beziehen durch alle Buchhandlungen und Postanstalten

Die Herren Mitarbeiter werden ersucht, alle Beiträge aus dem Gesamtgebiete der Botanik an Herrn Prof. Dr. Goebel, München, Menzingerstr. 15, Beiträge aus dem Gebiete der Zoologie, vgl. Anatomie und Entwickelungsgeschichte an Herrn Prof. Dr. R. Hertwig, München, alte Akademie, alle übrigen an Herrn Prof. Dr. Werner Rosenthal, z. Z. Erlangen, Auf dem Berg 14, einsenden zu wollen.

Bd. XXXVI. 20. Dezember 1916. № 11 u. 12.

Inhalt: **Jollos**, Die Fortpflanzung der Infusorien und die potentielle Unsterblichkeit der Einzelligen. — **Voges**, Der Nestbau der Polydesmiden. — **Szymanski**, Die Haupt-Tiertypen in bezug auf die Verteilung der Ruhe- und Aktivitätsperioden im 24stündigen Zyklus. — **Eichwald**, Die Energetik der Organismen. — **v. Caron-Eldingen**, Erwiderung. — Kammerer, Allgemeine Biologie. — Brehm's Tierleben. — Küster, Pathologische Pflanzenanatomie in ihren Grundzügen. — Riebesell, Die mathematischen Grundlagen der Vererbungs- und Variationslehre. — Neuerschienene Bücher. — Register.

Die Fortpflanzung der Infusorien und die potentielle Unsterblichkeit der Einzelligen.

Von Victor Jollos.

Seitdem August Weismann in einer seiner tiefgründigsten Abhandlungen die Frage nach der Notwendigkeit des Sterbens für alles Lebende aufwarf und auf den Unterschied zwischen einzelligen und vielzelligen Lebewesen gegenüber Altern und Tod hinwies, ist die „potentielle Unsterblichkeit“ der Protisten von vielen Forschern behandelt worden Nicht nur in theoretischen Betrachtungen wurde zu den Weismann'schen Gedankengängen Stellung genommen — sehr bald versuchte man auch durch Beobachtung und Experiment ihre Richtigkeit zu prüfen. Die Fragestellung war hierbei eine recht einfache: Gibt es bei genau verfolgten Protistenkulturen mit Notwendigkeit, also physiologisch auftretende Alters- und Todeserscheinungen? Und wenn solche nachweisbar sind, welche Einrichtungen bewahren die gealterten Individuen vorm Tode und damit die Art und letzten Endes also alle Protisten vor dem völligen Untergange? (Denn dass dann solche Einrichtungen vorhanden sein müssten, ist ohne weiteres klar, da ja z. B. bei einem sich nur

durch Zweiteilung vermehrenden Organismus die Generationen kontinuierlich restlos ineinander übergehen und alle Individuen also genau genommen gleich alt sind.)

Maupas glaubte diese Fragen durch seine Feststellungen an Infusorien eindeutig beantworten zu können Er fand bei allen längere Zeit geführten Infusorienkulturen allmählich auftretende und sich ständig verstärkende Degenerationserscheinungen, denen schließlich alle Infusorien unrettbar erlagen — wenn sie nicht zur Konjugation schreiten konnten. Individuen dagegen, die sich gepaart hatten, verhielten sich danach wieder ganz normal und konnten sich von neuem lange Zeit durch Teilung vermehren, bis wieder Konjugation oder, bei ihrer Verhinderung, Degeneration einsetzte. — Maupas kam daher gegenüber Weismann zu dem Schlusse, dass auch die Einzelligen ganz wie die Metazoen altern und natürlichem Tode unterworfen sind. Der Jungbrunnen aber, der sie allein vor dem Untergange retten könne, sei die Paarung. Aus inneren Bedingungen erfolge demnach die Konjugation, so dass der ganze Lebenslauf der Infusorien durch innere Bedingungen festgelegte Zyklen darstellen würde.

Damit mündet die experimentelle Prüfung der potentiellen Unsterblichkeit der Einzelligen in eine andere viel behandelte physiologische Frage: Werden die Fortpflanzungserscheinungen in ihrem Wechsel durch innere oder durch äußere Faktoren bedingt? Oder spezieller und schärfer formuliert: Ist die Befruchtung bezw. ein sie ersetzender Vorgang eine für die Lebensvorgänge unbedingte innere Notwendigkeit, oder wird sie durch Außenbedingungen hervorgerufen und ist vermeidbar?

Überall, wo die experimentelle Forschung den Wechsel von Fortpflanzungserscheinungen aufzuklären suchte, stoßen wir auf diese Frage und zugleich auf eine Scheidung der Ansichten. Erinnert sei nur an die Kontroversen über die Bedingungen der Fortpflanzung von Daphniden und Rotatorien, vor allem aber an die schönen Untersuchungen von Klebs, der für Algen und Pilze dies Problem bis zu einem gewissen Grade klären konnte.

Auch bei der Beurteilung der Fortpflanzung der Infusorien finden wir bald die gleichen Gegensätze: Während zunächst Calkins und R. Hertwig auf Grund ausgedehnter Untersuchungen in Übereinstimmung mit Maupas die Konjugation für unbedingt notwendig für die dauernde Erhaltung des Lebens der Infusorien erklären, betont späterhin besonders Enriques im Hinblick auf seine abweichenden Züchtungsergebnisse mit aller Entschiedenheit, dass es durchaus möglich ist, Infusorien hunderte von Generationen hindurch unter Ausschluss von Konjugation zu kultivieren, ohne dass Degenerationen oder Depressionen auftreten. Die von Maupas, Calkins, Hertwig u. a. nachgewiesenen Depressions- und Aus-

sterbeerscheinungen führte Enriques wohl mit Recht auf die von seinen Vorgängern angewandten Kulturmethoden zurück, bei denen es vor allem — zum mindesten zeitweise — zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten im Kulturmedium kommen konnte. Enriques schließt also, ganz analog den Feststellungen von Klebs an Algen und Pilzen, dass die Infusorien sich beliebig lange durch Teilung vermehren können, ohne zu altern, und somit nicht durch innere, sondern durch äußere Faktoren, speziell die chemische Zusammensetzung des umgebenden Mediums zur Konjugation veranlasst werden.

Durch die sorgfältigen Kulturversuche von Woodruff, die unter Innehaltung der schon von Weismann Maupas' Versuchsanordnung gegenüber geforderten Modifikationen durchgeführt wurden, schienen diese Ansichten endgültig sichergestellt und die innerlich bedingten Fortpflanzungszyklen im Sinne von Maupas-Calkins widerlegt; gelang es doch Woodruff Jahre hindurch mehrere tausend Generationen von *Paramaecium aurelia* unter sicherem Ausschluss von Konjugation bei vollster Lebensfrische zu züchten. —

Dennoch brachten gerade die Untersuchungen Woodruff's im weiteren wieder einen Umschwung: zwar die Lebenszyklen im Sinne von Maupas-Calkins wurden von ihm verworfen, andererseits fand er aber doch bei seinen Kulturen periodische Schwankungen der Teilungsfrequenz. Und diese „Rhythmen" sind nach Woodruff durch innere Bedingungen hervorgerufen.

Mit der Herabsetzung der Teilungsfrequenz parallel gehen nun, wie die von Woodruff und Fräulein Erdmann in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen ergaben, komplizierte Prozesse am Kernapparat der Paramaecien, die offenbar mit der von R. Hertwig vor Jahren auf Grund gelegentlicher Befunde mitgeteilten und inzwischen ausführlicher beschriebenen Parthenogenese identisch sind, von Woodruff und Frl. Erdmann aber als sexueller Vorgang sui generis angesehen und mit dem Namen „Endomixis" belegt werden.

Bevor wir auf die Bedeutung dieser interessanten Feststellungen für das Todes- und Fortpflanzungsproblem eingehen, wollen wir uns die Vorgänge selbst kurz vor Augen führen und kritisch werten:

Bekanntlich geht im Verlaufe der Konjugation der Paramaecien [1]) der Macronucleus zugrunde, während der Micronucleus durch zweimalige Teilung vier Kerne entstehen lässt, von denen drei degenerieren, während der vierte sich noch einmal in stationären- und Wanderkern durchschnürt. Die Wanderkerne treten wechselseitig in den anderen Konjuganten über und verschmelzen dort mit dem

1) Auf die für diese prinzipielle Betrachtung unwichtigen Unterschiede im Verhalten von *Paramaecium caudatum* und *P. aurelia* soll hier nicht eingegangen werden.

stationären Kern des Partners. Durch Teilungen des Synkaryons werden alsdann neue Mikronuclei und Makronucleusanlagen gebildet. — Sämtliche erwähnten Teilungen des Mikronucleus unterscheiden sich von den bei der vegetativen Vermehrung zu beobachtenden nicht unerheblich, erscheinen aber unter sich recht ähnlich. Daher und wegen der großen Zahl der beteiligten chromatischen Elemente konnte es für Paramaecium bis jetzt auch noch nicht klargestellt werden, welche der drei vor Bildung des Synkaryons nachweisbaren Mikronucleusdurchschnürungen die Reduktionsteilung ist. —

Fig. 1.

Parthenogenesis von *Paramaecium aurelia*. Zerfall des Makronukleus in „wurstförmige Schlingen".

Bei der „Endomixis" von Woodruff und Fräulein Erdmann finden in einem Infusor ganz ähnliche Vorgänge statt: Der Makronucleus zerfällt (und zwar mitunter auch zunächst in die von der Konjugation bekannten, aber bei der „Endomixis" bisher vermissten „wurstförmigen Schlingen" (s. Fig. 1), der Mikronucleus teilt sich zweimal, drei der Tochterkerne degenerieren, während aus dem vierten durch wiederholte Teilung neue Mikronuclei und Makronucleusanlagen hervorgehen.

Gegenüber den Erscheinungen bei der Konjugation unterbleibt also nur eine Mikronucleusteilung und natürlich die Vereinigung zweier Kerne verschiedener Individuen.

Über den Charakter der Mikronucleusteilungen könnte man nach den Angaben von Woodruff und Erdmann bei *Paramaecium aurelia* im Zweifel sein und noch am ehesten eine Übereinstimmung mit den vegetativen Vermehrungsdurchschnürungen vermuten. Aus den Feststellungen von R. Hertwig geht aber klar hervor, dass sie durchaus dem Teilungstyp bei der Konjugation entsprechen, eine Feststellung, die durch die späteren Befunde von Woodruff und Erdmann für *Paramaecium caudatum* und ebenso durch meine eigenen Beobachtungen für beide Arten bestätigt wird[2]).

Damit ist aber auch die Wertung des ganzen Prozesses gegeben: Es handelt sich um die morphologische Struktur und das Verhalten von Gametenkernen bei Ausschluss einer Kernkopulation, also um eine richtige Parthenogenese, wie dies denn auch schon Richard Hertwig, der erste Entdecker dieser Vorgänge, von

2) Tatsächlich variieren die zu beobachtenden Teilungsbilder nicht unbeträchtlich, wie dies schon Hertwig vermutete.

vornherein erkannte und ebenso späterhin Popoff, der auf sie bei seinen experimentellen Untersuchungen stieß, allerdings ohne an die Übereinstimmung mit den alten Hertwig'schen Beobachtungen zu denken[3]).

Und zwar handelt es sich offenbar um eine „diploide Parthenogenese", d. h um einen unreduzierten Gametenkern, da das Fehlen der einen Mikronucleusdurchschnürung wohl nur als Ausfall der Reduktionsteilung gedeutet werden kann[4]).

Woodruff und Fräulein Erdmann sind allerdings anderer Ansicht. Sie geben zwar eine ganz richtige Definition der Parthenogenese im Anschluss an Winkler, die also auch die Entwicklung eines unreduzierten Gameten berücksichtigt. Im weiteren verlangen sie aber vor Zurückziehung der Bezeichnung „Endomixis" merkwürdigerweise immer den Nachweis der Reduktionsteilung und übersehen, dass alle für Paramaecien überhaupt möglichen Kriterien der diploiden (= „somatischen") Parthenogenese gegeben sind; handelt es sich doch bei den Paramaecien, wie bei den meisten Infusorien, nicht um spezifische Gameten, sondern nur um spezifische Gametenkerne!

Der Name „Endomixis" ist also zu streichen. Er wäre auch ohnehin recht unzweckmäßig, da er die ausschließlich für die Vereinigung von Kernen verwandte Bezeichnung „Mixis" mit gänzlich hypothetischen Kern-Plasmamischungen verquickte. Läge keine Parthenogenesis vor, so könnte man daher nur von einer Regeneration des Makronucleus sprechen! —

Parthenogenetische Prozesse kommen nun, wie Woodruff und Fräulein Erdmann mit Recht hervorheben, nicht nur bei einzelnen lange geführten Kulturen, sondern offenbar ganz allgemein bei Paramaecium vor. So konnte ich sie bei sämtlichen daraufhin ge-

---

3) Auch Calkins kommt, wie ich dem Vortrage von Fräulein Erdmann entnehme, zu einer entsprechenden Wertung der Befunde von Woodruff und Erdmann. Seine Abhandlung war mir bisher infolge der Kriegsverhältnisse leider nicht zugänglich.

4) Es sei aber darauf hingewiesen, dass aus dem Fehlen einer Mikronucleusteilung bei der Parthenogenesis gegenüber der Konjugation noch keineswegs hervorgeht, dass gerade die dritte, bei der Konjugation zur Bildung von stationärem und Wanderkern führende Teilung ausfällt, wie dies Woodruff und Fräulein Erdmann ohne weiteres annehmen, die damit eben diese dritte Teilung als Reduktionsteilung bewiesen zu haben glauben. Bei der Ähnlichkeit der drei Teilungen bedarf es zur Entscheidung dieser Frage viel genauerer zytologischer Untersuchung, als sie bisher vorliegt. Die experimentelle Forschung hat in diesem Punkte auch noch keine eindeutigen Ergebnisse gebracht (vgl. Jollos 1913 a), während die einzigen bisher bei anderen Infusorien vorliegenden exakten Befunde über Zahlenreduktion diese gerade in die zweite resp. erste Teilung des Mikronucleus verlegen! (Prandtl, Popoff, Enriques). Die von Fräulein Erdmann fälschlich zitierte Untersuchung von Mulsow über Stentor lässt dagegen gerade diese Frage ausdrücklich unentschieden!

prüften Stämmen — 2 von *Paramaecium caudatum* und 3 von *P. aurelia*, von denen zwei dazu aus dem Freien frisch isoliert wurden, — nachweisen. — Und es erhebt sich jetzt für uns gegenüber der Parthenogenese dieselbe Frage, wie sie für die Konjugation durch die Arbeiten von Enriques und Woodruff geklärt schien: Ist sie durch die innere Konstitution der Infusorien oder durch äußere Faktoren bedingt? Ist sie also für die Erhaltung des Lebens der Paramaecien notwendig oder vermeidbar und umgekehrt jeder Zeit auszulösen? —

Um gerade auf diesem Gebiete häufigen Missverständnissen und Unklarheiten vorzubeugen, müssen wir zunächst einmal feststellen, was unter „äußeren Faktoren" verstanden werden soll: Wir müssen unterscheiden zwischen unmittelbaren Einwirkungen der Außenwelt, ihren mittelbaren Einwirkungen und der ererbten Konstitution des Organismus. Wir setzen also der ererbten Konstitution als innerem Faktor — als äußere Faktoren nicht nur die im Moment vor Eintritt der Konjugation oder Parthenogenesis vorhandenen äußeren Bedingungen gegenüber, sondern daneben auch noch die Summe der Einflüsse der Außenwelt, denen die betreffenden Infusorien während ihres ganzen vorangegangenen Lebens ausgesetzt waren, und durch die besondere „innere Bedingungen" im Sinne von Klebs geschaffen wurden.

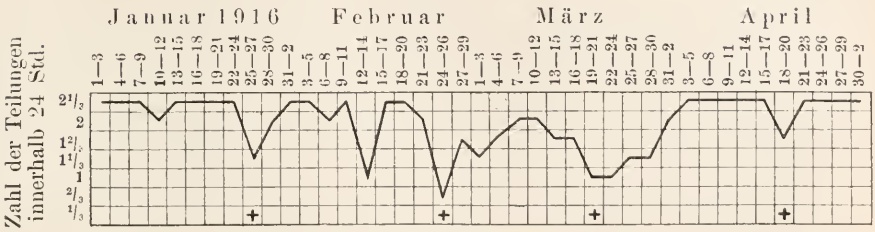
Der Eintritt der Parthenogenesis oder Konjugation bei Paramaecium hängt z. B. sicherlich nicht nur von einem unmittelbaren äußeren Faktor ab, wie dies nach Klebs bei manchen Algen und Pilzen der Fall ist und gelegentlich allzu einseitig auch von den Infusorien angenommen wurde; vielmehr ist ihr Zustandekommen außer von der chemischen Zusammensetzung des Mediums offenbar auch noch bedingt durch gewisse intracelluläre Veränderungen, vor allem des Makronucleus. Wir stimmen also Richard Hertwig durchaus zu, wenn er es für ein aussichtsloses Beginnen erklärt, innere Bedingungen bei der ursächlichen Erklärung der Befruchtungsprozesse gänzlich ausschließen zu wollen. Aber die Frage ist nur, ob dies „innere Bedingungen" im oben definierten Sinne sind, also doch mittelbare Einwirkungen der Außenwelt oder aber, ob sie nur auf der ererbten inneren Konstitution beruhen, also von vornherein festgelegt sind, wie es z. B. ursprünglich für den Generationswechsel der Daphniden angegeben wurde, und wie es wohl auch Fräulein Erdmann vorschwebt, wenn sie sagt, dass die Parthenogenese bei Paramaecium nach einer bestimmten[5]) Anzahl vegetativer Teilungen eintritt.

Eine Prüfung von nach der Methode Woodruff's geführten Paramaeciumkulturen legt einen solchen Schluss allerdings nahe.

5) Im Original gesperrt.

In recht regelmäßiger Folge sehen wir auf einer Kurve der Teilungsfrequenz (Fig. 2) Parthenogenesis auftreten, und da ja die äußeren

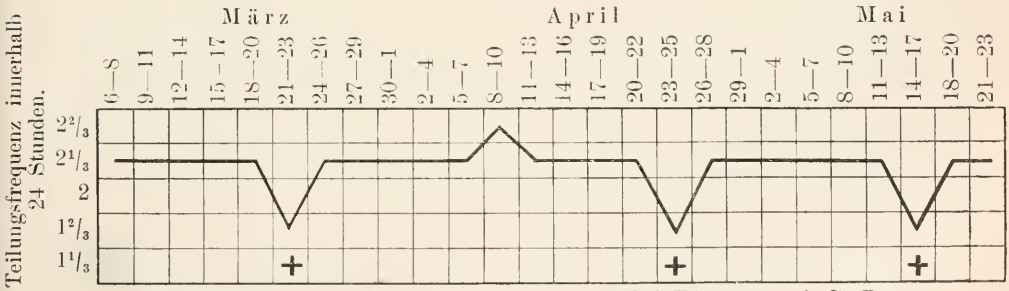
Fig. 2.



+ = Parthenogenese.

Bedingungen, Temperatur und Medium möglichst gleichmäßig gehalten wurden und, wie Woodruff's jahrelange Zuchten beweisen, für die Erhaltung der Infusorien günstig sind, so könnte der Eintritt der Parthenogenesis in der Tat durch die ererbte innere Konstitution bestimmt festgelegt erscheinen. Ja, wenn man den bei der Kultur der Paramaecien am schlechtesten zu beherrschenden Faktor, die Ernährung, dadurch noch gleichmäßiger gestaltet, dass man die als Medium verwandte 0,025 % Bouillonlösung aus einer Reinkultur des besonders üppig sich entwickelnden *Bacterium proteus*

Fig. 3.



Teilungsfrequenz von *Paramaecium caudatum* bei Fütterung mit B. Proteus.

beimpft, so lassen sich sogar die in den Zuchten sonst noch (abgesehen von den Zeiten der Parthenogenese) zu beobachtenden Schwankungen (Fig. 2) häufig für einige Wochen fast ganz beseitigen (Fig. 3), ohne dass sich an dem periodischen Auftreten der parthenogenetischen Prozesse etwas ändert.

Einen Unterschied ergeben diese Beobachtungen allerdings gegenüber den Angaben und besonders der schematischen Darstellung (Fig. 4) von Woodruff: Wir finden keineswegs eine wellenförmig verlaufende Teilungsfrequenzkurve, sondern eine recht gleichmäßige Teilungsrate, die zur Zeit der Parthenogenese plötzlich

abfällt, um danach wieder ihre alte Höhe zu erreichen. Besonders klar zeigt dies die mit Reinkulturen von Proteus gefütterte Zucht (Fig. 3), sowie die die tägliche Teilungsrate verzeichnende Kurve der Figur 5.

Fig. 4.

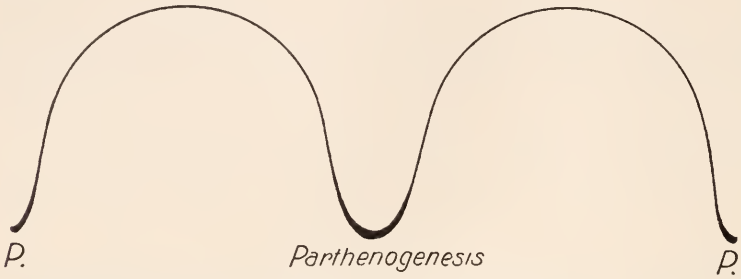
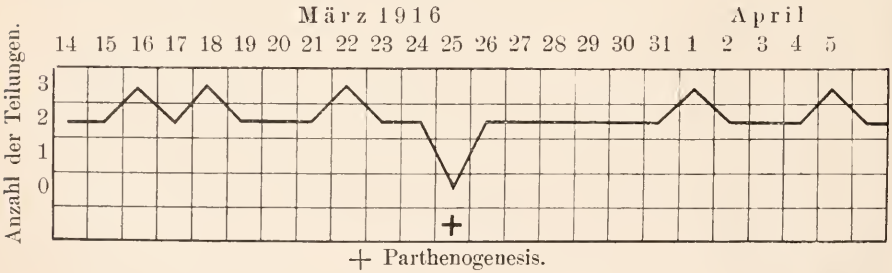


Fig. 4. Schema des Zusammenhanges von Teilungsfrequenz und Parthenogenese nach Woodruff-Erdmann.

Ich kann also auch die Beschleunigung der Teilungsfrequenz über die Norm nach vollzogener Parthenogenese nicht bestätigen, auf die Woodruff und Fräulein Erdmann so großen Wert legen, und die von anderer Seite schon zur Grundlage für ein Hypothesengebäude benutzt wurde.

Fig. 5.



+ Parthenogenesis.

An der relativen Regelmäßigkeit des Auftretens von Parthenogenesis unter den genannten gleichmäßigen Außenbedingungen ändert unsere Festellung natürlich nichts; aber andererseits beweist dieses regelmäßige Auftreten noch keineswegs den konstitutionellen Ursprung der Parthenogenese; denn die gleichmäßigen Bedingungen können ja auch gleichmäßige sich summierende oder periodisch einwirkende Schädigungen enthalten.

Dieser Gedanke wird uns nahe gelegt, wenn wir bei ausgedehnteren Untersuchungen finden müssen, dass gar manche Paramaecinmstämme, sowohl von *P. aurelia*, wie von *P. caudatum*, sich unter den von Woodruff gewählten Kulturbedingungen, d. h. auf dem Objektträger mit einigen Tropfen einer 0,025 % Lösung von Liebig's Fleischextrakt, überhaupt nicht züchten lassen, während

andere nach verhältnismäßig kurzer Zeit eingehen[6]). Und selbst bei den dauernd oder doch recht lange in dieser Weise kultivierbaren Stämmen treten Störungen auf, sobald man die tägliche Isolierung und Übertragung der Paramaecien unterlässt oder die Kulturen in höhere, aber an sich noch durchaus zuträgliche Temperaturen versetzt. Diese Störungen zeigen sich zuerst in einer Herabsetzung der Teilungsfrequenz: Paramaecien, die sich bei 21° bei täglicher Isolierung regelmäßig zweimal innerhalb 24 Stunden teilen, weisen dann in 72 Stunden fast immer nur 5 statt 6 Teilungsschritte auf. — Noch auffälliger sind diese Unregelmäßigkeiten bei 30°: So fanden sich bei einem Stamme von *Paramaecium aurelia* mit sonst täglich 3—4 Teilungen bei Fortfall der täglichen Isolierung nach 48 Stunden meist nur 5, nach 72 Stunden nur 6—7 Teilungsschritte.

Und untersucht man die Paramaecien aus solchen ohne Trennung gezogenen Kulturen, so stößt man in einem sehr hohen Prozentsatz eben auf parthenogenetische Vorgänge!

Bei manchen Stämmen lassen sie sich mit fast absoluter Sicherheit auf diese Weise nach 2—3 Tagen erzielen, besonders wenn man die Objektträgerkulturen aus 20° unmittelbar in 30° überführt. Bei anderen ist eine noch größere Anhäufung von Infusorien erforderlich, wie sie sich bei gleicher Versuchsanordnung erst nach 4—6 Tagen einstellt.

Auch durch Hinzufügung von stark verdünntem Ammoniakwasser lassen sich, wenn auch weniger sicher, die gleichen Vorgänge auslösen, wie schon aus den aus anderen Gedankengängen heraus unternommenen Untersuchungen von Popoff hervorgeht. Wesentlich bessere Erfolge hatte ich dagegen durch Einführung von Kulturen verschiedener Bakterien, die gelegentlich als Verunreinigungen der normalen Infusorienzuchten aufgetreten waren und sich dabei als schädigend erwiesen hatten[7]). — Mit der Feststellung der Auslösbarkeit der Parthenogenese von *Paramaecium* ist aber die Möglichkeit einer exakten Prüfung der von uns aufgeworfenen allgemeinen Fragen gegeben.

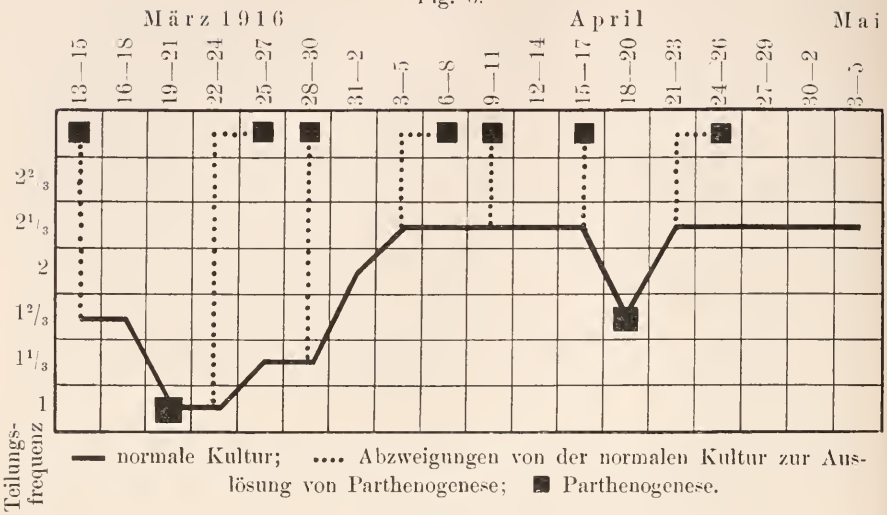
Die hierbei gewonnenen Resultate seien mit Hilfe der Fig. 6—8 veranschaulicht:

Von einer unter den normalen Bedingungen von Woodruff bei einer konstanten Temperatur von 21° geführten Hauptkultur

6) Für *Paramaecium caudatum* haben inzwischen Woodruff und Erdmann (in einer mir infolge der Kriegsverhältnisse leider erst nach Abschluss meiner Untersuchungen zugänglich gewordenen Arbeit) auf diese Schwierigkeiten der Kultur hingewiesen. Ich möchte aber betonen, dass es nicht nur während der Parthenogenese selbst, sondern auch bei der rein vegetativen Vermehrung zu Störungen u. a. der Zellteilung kommen kann.

7) Genauer soll auf diese verschiedenen Bedingungen der Auslösung der Parthenogenese in anderem Zusammenhange eingegangen werden.

Fig. 6.

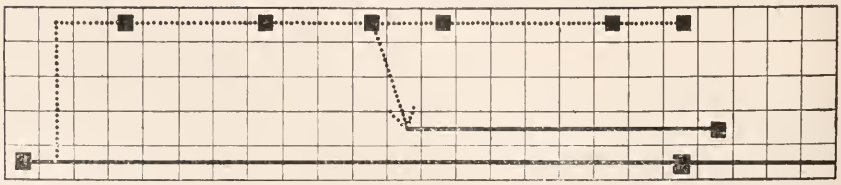


von *Paramaecium aurelia*, deren Teilungsfrequenz in der Zeit vom 13. März bis 5. Mai 1916 die durchgehende Kurve auf Fig. 6 wiedergibt, wurden andere Zuchten abgezweigt und in die erwähnten, Parthenogenesis begünstigenden Bedingungen versetzt. Dies geschah am 14., 23. und 28. März sowie am 4., 9., 15. und 23. April. Während in der Hauptkultur Parthenogenesis zwischen dem 19. und 21. März und dann erst zwischen dem 18. und 20. April stattfand, wurde sie in sämtlichen Zweigkulturen, sowohl in den unmittelbar nach der Parthenogenese der Hauptkultur wie in den zu einer späteren Periode von dieser abgezweigten, in den nächsten Tagen nach Versetzung unter die auslösenden Bedingungen festgestellt, wie dies aus Fig. 6 klar zu ersehen ist.

Damit dürfte wohl eindeutig bewiesen sein, dass die Parthenogenesis in jedem Zeitpunkt des Lebens der Paramaecien durch äußere Faktoren ausgelöst werden kann.

Ähnlich ist das Ergebnis der in Fig. 7 wiedergegebenen Versuchsanordnung: Zum besseren Vergleich der ja bei verschiedenen Temperaturen geführten Kulturen bedeutet hier jeder Abschnitt der

Fig. 7.



■ Parthenogenesis; —— Normalkultur; •••• Abzweigungen von der Normalkultur zur Auslösung von Parthenogenesis (weitere Erklärung im Text).

Abszisse im Gegensatz zu den anderen Kurvenaufnahmen nicht 3 Tage, sondern 3 Teilungsschritte. Der Eintritt von Parthenogenese ist in gleicher Weise (■) wie oben markiert. Von einer „Normalkultur“ (—) wurde unmittelbar nach Ablauf einer Parthenogenese eine zweite abgezweigt (····) und in Parthenogenese begünstigende Außenbedingungen versetzt. Während in der Ausgangskultur die nächste Parthenogenese erst nach 56 Teilungsschritten eintrat, finden wir sie unter den auslösenden Außenbedingungen bereits nach 8 Teilungen, dann, bei entsprechender Weiterführung der Abkömmlinge, wieder nach 10, 9, 6, 15 und wieder 6 Teilungsschritten.

Sechsmal konnte hier also durch entsprechende Wahl der äußeren Bedingungen Parthenogenesis erzwungen werden, ehe sie auch bei gleicher Gesamtzahl der Teilungsschritte in der nicht besonders behandelten Parallelkultur gleichen Ausgangs wieder auftrat! (Dass dabei durch die Veränderung der Außenbedingungen nicht etwa dauernde Umstimmung in der periodischen Folge der Parthenogenesen bewirkt wurde, zeigt das Verhalten bei Rückversetzung in die „normalen“ Verhältnisse.)

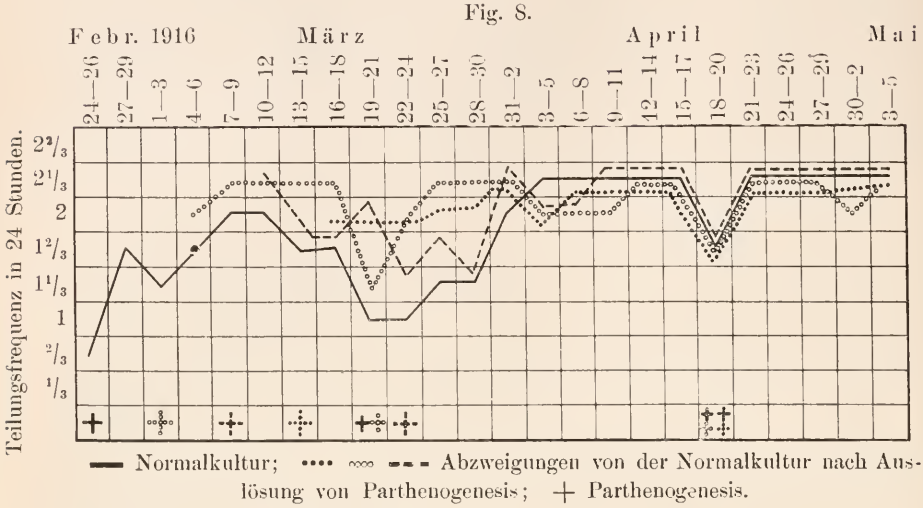
Durch spätere Verbesserungen der Methode und Wahl besonders geeigneter Stämme von Paramaecium konnten noch regelmäßigere Ergebnisse erzielt werden, vor allem infolge Herabsetzung der Sterblichkeit der dem Experiment unterworfenen Zuchten. Bei einem Stamme war es schließlich möglich, während mehrerer Wochen jeden dritten Tag d. h. nach durchschnittlich je 5—6 Teilungen Parthenogenese nachzuweisen!

Daran dass Parthenogenesis jederzeit durch entsprechende Faktoren der Außenwelt hervorgerufen werden kann, ist somit nicht zu zweifeln. Wie aber müssen wir ihr Auftreten in den nach dem Vorgange Woodruff's geführten Kulturen beurteilen? Handelt es sich auch hier um äußere Einwirkungen? Auch darüber erlaubt uns die experimentelle vergleichende Untersuchung eine Antwort: Wir bedienen uns dazu der folgenden, in Fig. 8 wiedergegebenen Versuchsanordnung:

Von einer „Normalkultur“ nach Woodruff werden im bestimmten Abständen Zweigkulturen abgeleitet, zur Parthenogenese gebracht und dann wieder in die alten normalen Bedingungen zurückversetzt. Man erhält auf diese Weise eine beliebige Anzahl — in unserem Falle vier — unter gleichen Außenbedingungen stehender Kulturen gleichen Stammes, also gleicher erblicher Konstitution, die aber zu verschiedener Zeit die letzte Parthenogenese vollzogen haben. Ist daher der Eintritt der Parthenogenese in den nach Woodruff's Art geführten Kulturen durch die erbliche Konstitution veranlaßt, so muss zwischen den einzelnen Zweiglinien der primäre zeitliche Abstand in dem Auftreten der weiteren Par-

thenogenesen gewahrt bleiben. Wirken dagegen äußere Kulturbedingungen Parthenogenese auslösend, so ist ein rascher oder allmählicher Ausgleich zu erwarten.

Fig. 8.



— Normalkultur; ···· ∾∾ - - - Abzweigungen von der Normalkultur nach Auslösung von Parthenogenesis; + Parthenogenesis.

Wie Fig. 8 zeigt, kommt es tatsächlich zu einem solchen Ausgleich der verschiedenen Parallelkulturen: Während in der Ausgangskultur die letzte Parthenogenese vor Beginn der vergleichenden Beobachtung am 24./25. Februar stattgefunden hatte, wurde in den drei Zweiglinien noch am 1./2. März, 7./8. und 13./14. März je eine Parthenogenesis ausgelöst. Dennoch finden wir am 20. März schon gleichzeitig in der Hauptkultur (—) und der ersten Zweiglinie (∾∾) den Beginn parthenogenetischer Prozesse und nur zwei Tage später in der zweiten Abzweigung (- - -). Und am 19. April ist die nächste Parthenogenese gleichzeitig in allen vier Parallelkulturen nachzuweisen!

In anderen Versuchsserien erfolgte der Ausgleich etwas langsamer und allmählicher, und dies dürfte vielleicht die Regel darstellen. Aber für die Beurteilung ist die Zeitdauer des Ausgleiches natürlich ohne Belang, da eben alleine durch die stets feststellbare Tatsache seines Zustandekommens bewiesen ist, dass auch in den nach der Methode Woodruff's geführten Kulturen letzten Endes äußere Faktoren den Eintritt der Parthenogenese bedingen. Und zwar spricht manches dafür, dass es sich hier wenigstens häufig um zweierlei Faktoren händelt: einmal um sich summierende ständige Einwirkungen der Kulturbedingungen, daneben aber auch noch um nur gelegentlich einsetzende Faktoren, die nur dann Parthenogenese auslösen, wenn die sich summierenden ständigen Einwirkungen bereits einen gewissen Grad erlangt haben. Solche gelegentlich wirkenden Faktoren (die wir uns als Änderungen der Bakterien-

flora, leichteste Temperaturschwankungen oder dergl. vorstellen könnten) waren offenbar z. B. bei dem in Fig. 8 wiedergegebenen Beobachtungsmaterial in der Zeit vom 19.—22. März beteiligt. In dreien der verfolgten Zuchten, bei denen es bereits zu einer hinreichenden Summierung der Schädigungen durch die allgemeinen Kulturbedingungen gekommen war, finden wir daher in dieser Zeit auch Parthenogenese; nicht dagegen in der vierten (••••), die sich damals noch nicht lange genug seit ihrer letzten Reorganisation unter diesen Kulturbedingungen befand. — Und auch die Erfahrungen bei der experimentellen Auslösung der Parthenogenese zeigen, dass es bei den Woodruff'schen Kulturbedingungen zu einer allmählichen Summierung von Veränderungen kommt, die mit den von uns absichtlich erzielten gleichgerichtet sind. Denn nicht nur bedarf es zur Auslösung einer neuen Parthenogenese unmittelbar nach einer eben abgeschlossenen länger dauernder (oder intensiverer) Einwirkungen (vgl. Fig. 6) als zu einer späteren Periode, sondern auch der Prozentsatz der durch einfaches Unterlassen der täglichen Isolierung hervorrufbaren Parthenogenesen steigt mit dem Zeitabstand von der letzten Parthenogenesis recht merklich.

Es liegen demnach bei Paramaecium in gewisser Hinsicht ähnliche Verhältnisse vor, wie sie die neueren Untersuchungen z. B. für Daphniden ergeben haben, bei denen ja offenbar auch spätere Generationen (oder spätere Würfe des gleichen Weibchens) in ihrer Fortpflanzungsweise ständig leichter durch experimentelle Bedingungen beeinflussbar sind. Nur können wir bei den Paramaecien jetzt schon mit größerer Sicherheit in jedem Lebensaugenblicke die Parthenogenese erzwingen als bei den Daphniden die befruchtungsbedürftigen Eier.

Fassen wir die bisher mitgeteilten Versuche und Beobachtungen über die Parthenogenese von *Paramaecium* noch einmal zusammen, so wäre nunmehr bewiesen, dass

1. Faktoren der Außenwelt in jedem Lebensabschnitt von Paramaecium Parthenogenesis hervorrufen können, und dass
2. Faktoren der Außenwelt auch in den nach der Methode von Woodruff unter möglichst gleichmäßigen Bedingungen gehaltenen Kulturen den Eintritt der Parthenogenesis bedingen.

Nicht bewiesen ist damit aber noch, dass die erbliche Konstitution, die sich ja auch in der verschiedenen Häufigkeit der parthenogenetischen Prozesse bei verschiedenen unter gleichen Bedingungen gehaltenen Linien von Paramaecium zeigen kann, an sich Parthenogenese überhaupt nicht erfordert und diese also ebenso wie die Konjugation (und ohne wieder umgekehrt durch Konjugation ersetzt zu werden) ganz vermeidbar ist.

Einen solchen Beweis kann ich auf Grund meiner Beobachtungen und Versuche auch nicht führen. Es gelang mir zwar wiederholt, die parthenogenetischen Vorgänge (bei sicherem Ausschluss von Konjugation) erheblich hinauszuschieben; so bei einem in Objektträgerkulturen längstens nach 60 Teilungen zur Parthenogenese schreitenden Stamme von *P. aurelia* durch Aufzucht in größeren die tägliche genaue Musterung noch gerade zulassenden Gläsern und Verwendung von Salatwasser statt Bouillon bis auf 130—140, in einem Falle sogar bis nach 168 Teilungsschritten. Aber eine dauernde Ausschaltung der parthenogenetischen Prozesse war mir nicht möglich. Die Versuche in dieser Richtung stoßen zunächst einmal auch auf rein technische Schwierigkeiten: Um das Auftreten von Parthenogenese in den Versuchskulturen mit Sicherheit ausschließen zu können, erscheint vorerst die tägliche genaue Kontrolle jedes einzelnen Individuums erforderlich; dies macht bei längerer Versuchsdauer die Aufzucht in verhältnismäßig geringen Flüssigkeitsmengen notwendig Und gerade hierin liegt andererseits ein die Parthenogenese offenbar begünstigendes Moment vor, das wir nicht beseitigen können. ohne uns die erforderliche Übersicht zu nehmen! Vielleicht wird hier die Beobachtung von Dauermodifikationen (Jollos 1913) weiterführen, falls es gelingt, Dauermodifikationen festzustellen, deren Rückbildung nur bei Parthenogenese (resp. Konjugation) erfolgt. Bisher war mir dies noch nicht möglich, doch werden die Versuche in dieser Richtung fortgesetzt.

Dass unter günstigeren Bedingungen als die Objektträgerkulturen, wie die Zuchten in beschränkter Flüssigkeitsmenge überhaupt sie bieten, die parthenogenetischen Vorgänge sehr lange ausgeschaltet bleiben können, darf wohl nicht bezweifelt werden; aber mit recht großer Wahrscheinlichkeit können wir doch schon jetzt ferner sagen (wenn auch noch nicht mit Sicherheit beweisen), dass die Reorganisation des Makronucleus der Infusorien, denn dies ist ja bei Parthenogenese wie Konjugation mit das wichtigste Moment, sich nicht auf die Dauer vermeiden lässt.

Für diese Ansicht spricht nicht nur das von mir gelegentlich, allerdings trotz jahrelanger Beobachtungen nur sehr selten festgestellte Vorkommen parthenogenetischer Prozesse in großen unter durchaus günstigen Bedingungen gehaltenen Kulturen, sondern vor allem auch der Umstand, dass in derartigen von einem einzelnen Paramaecium nach vollzogener Parthenogenese aus angelegten großen (also nicht mehr in jedem einzelnen Infusor kontrollierbaren) Zuchten bei günstigsten Ernährungs- und Temperaturbedingungen zwar keine neue Parthenogenesis, wohl aber nach einiger Zeit eine merkliche Erleichterung ihrer experimentellen Auslösbarkeit nachgewiesen werden konnte. Auch unter solchen günstigen äußeren Bedingungen, und somit wohl ganz allgemein, bringen die Lebensvorgänge allmählich

sich steigernde Schädigungen des Makronucleus und schließlich die Notwendigkeit seiner Erneuerung mit sich.

Der Makronucleus besitzt also nur eine beschränkte Lebensdauer; nicht so beschränkt, wie es nach den in dieser Hinsicht ungünstigen Kulturbedingungen von Woodruff erschien, wie ja auch die Lebenszeit des Menschen nicht nach dem von, einer besonderen Schädigung ausgesetzten, Berufsklasse im Durchschnitt erreichten Alter allgemein bemessen werden kann — aber Altern und natürlichem Tode ist er offenbar doch unterworfen. —

Ist nun aber damit auch die Entscheidung über Weismann's Lehre von der potentiellen Unsterblichkeit der Protisten gefallen, von der wir bei unserer Betrachtung ausgingen? Wir müssen dies aufs entschiedenste verneinen.

Es ist merkwürdig, dass die experimentelle Prüfung der Unsterblichkeitslehre fast immer nur bei der Protistengruppe ansetzte, für die sie von vornherein nur sehr beschränkte Gültigkeit haben kann. Denn was wollte Weismann's Lehre sagen? Gegenüber der allgemeinen Anschauung, dass der Lebensprozess selbst mit Notwendigkeit stets den Tod mit sich bringe, wies er darauf hin, dass solche Auffassung eine nicht gerechtfertigte Verallgemeinerung der bei den höheren Lebewesen vorliegenden abgeleiteten Verhältnisse darstelle. Primär dagegen sei die lebendige Substanz „so eingerichtet in ihrer chemischen und molekularen Struktur, dass der Kreislauf des Stoffes, der das Leben ausmacht, immer wieder in sich zurückläuft, somit immer wieder von neuem beginnen kann, so lange als die äußeren Bedingungen dafür vorhanden sind“. Diese primären Verhältnisse glaubte Weismann noch bei den Protisten im allgemeinen vorzufinden. Eine Änderung trat nach seiner Ansicht erst sekundär auf, mit Ausbildung der Mehrzelligkeit, der höheren Differenzierung und Trennung von somatischen und generativen Elementen: Nur den generativen Zellen verblieb wie den Einzelligen die potentielle Unsterblichkeit, und ihre Kontinuität ermöglichte die Erhaltung des Lebens; das Soma aber konnte sich differenzieren, unabhängig davon, ob solche Umgestaltung mit dauernder Funktion vereinbar war. Auf dieser Entwicklungsstufe erst konnte der physiologische Tod entstehen, und er musste es auch, gerade in Konsequenz Weismann'scher Anschauungen, denen zufolge jede für die Arterhaltung überflüssig gewordene Struktur die Vollkommenheit ihrer Ausbildung allmählich verliert!

Eine Trennung von somatischem und generativem Material ganz entsprechend wie bei den Metazoen zeigen nun unter den Einzelligen gerade die Infusorien infolge der Entwicklung von Makro- und Mikronucleus. Nur der Mikronucleus enthält hier das Keimplasma, — der Makronucleus erscheint als rein somatische Bildung, wie dies Weismann selbst (auf Grund der Arbeiten von R. Hertwig und

Maupas) ausdrücklich betonte, und wie auch Richard Hertwig in seiner großen Infusorienarbeit hervorhob Als somatische Bildung aber ist er im Sinne Weismann's natürlich dem Tode verfallen.

Wenn also Rh. Erdmann meint, dass Woodruff seine zum Nachweis der potentiellen Unsterblichkeit der Einzelligen unternommenen Paramaeciumzuchten nach Feststellung des Auftretens von Parthenogenese aufgeben konnte, so ist demgegenüber darauf hinzuweisen, dass bei diesen Zuchten ein solcher Nachweis von vornherein unmöglich war, da eben den Paramaecien im Sinne Weismann's gar keine allgemeine potentielle Unsterblichkeit zukommen konnte. Denn dauernde Ausschaltung von Konjugation würde ja, ohne das Auftreten von Parthenogenese, bei Paramaecium dauernde Erhaltung des Makronucleus bedeuten, somit nicht die Unsterblichkeit des Keimplasma, sondern darüber hinaus eine potentielle Unsterblichkeit des Soma dartun!

Gerade der hierin negative Ausfall der Untersuchungen von Woodruff und Erdmann, wie auch der meinigen, entspricht somit durchaus den Voraussetzungen Weismann's, und er entzieht zugleich in den letzten Jahren geäußerten Anschauungen mancher Autoren (Doflein, Lipschütz, im gewissen Sinne auch R. Hertwig) den Boden, denen zufolge auch die somatischen Zellen der Metazoen an sich potentielle Unsterblichkeit besäßen und nur durch die allein dem Interesse des Ganzen ohne Rücksicht auf das Wohl der Einzelzelle dienende Funktion (Hertwig) oder aber durch die für Regenerationsprozesse ungünstige Zusammensetzung der Körpersäfte an einer Neuordnung verhindert würden und dem Untergange verfielen. Diese Anschauungen übersehen nur, dass den somatischen Zellen der Metazoen die somatischen Strukturen der Infusorien entsprechen, d. h. in erster Linie der Makronucleus, und gerade diese gehen ja bei den Regenerationsvorgängen zugrunde, und das, wie wir gesehen haben, auch unter den günstigsten äußeren Bedingungen und obwohl es sich um einzellige Organismen handelt! Also nicht durch äußere Verhältnisse bedingte Unmöglichkeit eines Reorganisationsprozesses ist das entscheidende Moment, sondern in gleicher Weise sind eben bei Protozoen wie Metazoen die somatisch differenzierten Teile dem Untergange geweiht — ganz wie es Weismann lehrte.

Und ebenso scheint mir endlich gerade die beschränkte Lebensdauer des Makronukleus der Infusorien Einwände ganz andere Art zu entkräften, die gegen Weismann's Anschauung erhoben wurden (Goette, Hartmann u. a) und die darin gipfeln, dass bei den Protisten Tod und Fortpflanzung zusammenfiele, da der Tod Abschluss und Auflösung des Individuums bedeute und ein Gleiches bei jeder Protistenteilung stattfände.

Gegen diese Auffassung ließ sich schon früher anführen, dass sie durch den häufig nur willkürlich fixierbaren Begriff der „Auflösung des Individuums“ die klare Problemstellung Weismann's wieder verwischt und daher doch auch den Tatsachen nicht ganz gerecht wird: Auch bei den (in diesem Punkte zum Vergleiche schon heranziehbaren) Metazoenzellen haben wir ja Teilungen, also ein analoges Aufhören und Neuentstehen des Zellindividuums. Mit dem Zelltode dagegen haben die Teilungen absolut nichts zu tun, da dieser doch ein daneben vorhandener Vorgang ganz anderer Art ist! — Durch den, allerdings nicht mit absoluter Sicherheit zu führenden, sondern nur wahrscheinlich gemachten, Nachweis der Erneuerungsbedürftigkeit des Makronucleus der Infusorien wird jetzt aber auch die Grundvoraussetzung dieser Anschauung widerlegt, zeigt sie uns doch, dass die Teilungen gar nicht die angenommene allgemeine „Verjüngung“ mit sich bringen, sondern im Gegenteil, dass die dem Altern überhaupt unterliegenden Strukturen der Protisten trotz aller Teilungen und unabhängig von ihnen fortschreitende Alterserscheinungen aufweisen, sterben und erneuert werden.

Auch bei den Protisten sind also Tod und Fortpflanzung durchaus verschiedene Vorgänge! —

Auf Grund der Beobachtungen an Infusorien sind die ersten Einwände gegen die Weismann'sche Lehre erhoben worden und werden bis in die neueste Zeit immer wieder erhoben. Aber gerade die kritische Sichtung der fremden wie der eigenen Beobachtungen und Versuche an Infusorien zeigte uns, dass die Grundanschauung August Weismann's noch heute durchaus zu recht besteht: Der Lebensprozess braucht den Keim des Todes nicht in sich zu enthalten, denn primär liegt in der Beschaffenheit der lebendigen Substanz der Einzelligen „kein Grund, weshalb der Kreislauf ihres Lebens, Teilung, Wachstum durch Assimilation und wiederum Teilung jemals enden solle . . .“

In einem Punkte freilich müssen wir auf Grund unserer inzwischen erweiterten und vertieften Kenntnisse der Protisten Weismann's Ansichten modifizieren: Nicht erst mit der Vielzelligkeit setzte der Tod ein, wir finden ihn vielmehr als Teilerscheinung („Partialtod“ R. Hertwig) auch im Reiche der Einzelligen fortschreitend ausgebildet, sehr sinnfällig wie wir sahen, bei den Infusorien, aber bald in dieser, bald in jener Form, bald geringe, bald große Teile der lebendigen Substanz erfassend auch bei den meisten, wenn nicht allen anderen heutigen Protistenformen. Sind doch die Protisten für uns nicht mehr die „einfachsten Organismen“, wie sie es noch für Weismann waren und bei dem damaligen Stande der Wissenschaft sein mussten, sondern „höchst entwickelte Zellen“.

Berlin-Dahlem, Kaiser Wilhelm Institut für Biologie Juli 1916.

Literatur.

Calkins, G. N. 1902: The life cycle of Paramaecium caudatum. Arch. f. Entwicklungsmechanik. Bd. 15.

Doflein, F. 1913: Das Unsterblichkeitsproblem im Tierreich. Freiburg.

Enriques, P. 1907, 1908: Die Konjugation und sexuelle Differenzierung der Infusorien. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 9 u. 12.

Erdmann, Rh. 1915: Endomixis und ihre Bedeutung für die Infusorienzelle. Sitzungsber. Gesellsch. naturf. Freunde Berlin.

Hartmann, M. 1902: Tod und Fortpflanzung. München.

Hertwig, R. 1889: Über die Konjugation der Infusorien. Abhandl. d. Kgl. Bayer. Akad. d. Wissensch. II, 17.

— 1906: Über den Ursprung des Todes. Beilage d. Allgem. Zeitung München.

— 1914: Über Parthenogenesis der Infusorien und die Depressionszustände der Protozoen. Biolog. Centralbl. Bd. 34.

Jollos, V. 1913: Experimentelle Untersuchungen an Infusorien. Biolog. Centralbl. Bd. 33.

— 1913a: Über die Konjugation der Infusorien. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 30.

Klebs, G. 1899: Über die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena, G. Fischer.

— 1904: Über Probleme der Entwicklung. Biolog. Centralbl. Bd. 24.

Lipschütz, A. 1915: Allgemeine Physiologie des Todes. Braunschweig, F. Vieweg.

Maupas, E 1888: Recherches expérimentales sur la multiplication des Infusoires ciliés. Arch. d. Zool. expér. et générale. t. 6.

— 1889: Le rajeunissement karyogamique chez les ciliés. ibidem. t. 7.

Mulsow, W. 1913: Die Konjugation von *Stentor coeruleus* und *Stentor polymorphus*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 28.

Popoff, M. 1908: Die Gametenbildung und Konjugation von *Carchesium polypinum*. Zeitschr. f. wissensch. Zool. Bd. 89.

— 1910: Experimentelle Zellstudien III. Arch. f. Zellforschung. Bd. 3.

Prandtl, H. 1906: Die Konjugation von *Didinium nasutium*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 7.

Prowazek, S. v. 1910: Einführung in die Physiologie der Einzelligen. Teubner. Leipzig.

Weismann, A. 1881: Über die Dauer des Lebens. Jena, G. Fischer.

— 1883: Über Leben und Tod. Jena, G. Fischer.

— 1890: Bemerkungen zu einigen Tagesproblemen. Biolog. Centralbl. Bd. 10.

— 1902: Vorträge über Descendenztheorie. Jena, G. Fischer.

Winkler, H. 1908: Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich. Jena, G. Fischer.

Woodruff, L. 1911: Two thousand generations of Paramaecium. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 21.

— and Baitsell 1911: Rhythms in the reproductive activity of Infusoria. Journ. exper. Zool. vol. 11.

— and Erdmann 1914: A normal periodic reorganisation process without cell fusion in Paramaecium. ibidem. vol. 17.

Zweibaum, J. 1912: Les conditions nécessaires et suffisantes pour la conjugaison de Paramaecium caudatum. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 26.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Biologisches Zentralblatt

Jahr/Year: 1916

Band/Volume: 36

Autor(en)/Author(s): Jollos Victor

Artikel/Article: Die Fortpflanzung der Infusorien und die potentielle Unsterblichkeit der Einzelligen. 497-514