

Aus dem Zoologischen Institut der Deutschen Universität in Prag.

Über spezifische und lokale Reduktion von Silber- und anderen Metallsalzen in den Kiemensäckchen von *Daphnia M.*

Von Josef Gicklhorn.

I.

Ausgangspunkt der vorliegenden Mitteilung waren folgende Überlegungen und Beobachtungen

Bei einer mikrochemischen Untersuchung über einige Eigenümlichkeiten der Verkalkung des Panzers der Daphniden versuchte ich als Ergänzung zu anderen angewendeten Reaktionen auch die von Molisch (12.) bei verkalkten Cystolithen gefundene Reduktion von Silbernitrat einmal auf ein tierisches Objekt zu übertragen. Nach Molisch's Verfahren, nämlich Einlegen lebender Blätter oder Schnitte in eine Iprozentige Lösung von AgNO_3 , erhält man eine überaus klare Darstellung der Cystolithen, bekanntlich jener ins Zellinnere vorspringenden, verschieden geformten und mit CaCO_3 — mitunter auch durch Kieselsäure inkrustierten Membranverdickungen, die für die Familie der Urticaceae, Moraceae, Cannabinaceae, Acanthaceae, Cucurbitaceae etc. charakteristisch sind. (Solereder 16. pag. 935.) Die Reduktion führt in diesen Fällen zu einer streng auf die verkalkten Cystolithen lokalisierten Schwärzung, wodurch sehr anschaulich die Verteilung der Cystolithen in den Blättern demonstriert werden kann. Überdies aber ist die Reduktion einer AgNO_3 -Lösung eine bequeme mikrochemische Hilfsreaktion, die mit der nötigen Kritik als Ergänzung zu anderen eindeutigen Nachweisen des Ca-Ions verwertet oder zur ersten Orientierung, bzw. zum Zwecke der Herstellung schöner Übersichtspräparate mit Vorteil herangezogen werden kann. (Molisch 12, pag. 479).

Überträgt man nun lebende Daphnien in eine schwache Silbernitratlösung, so bleiben die Tiere darin längere Zeit lebhaft beweglich und zeigen äußerlich keine Schädigung. Leitungswasser ist natürlich wegen des verschieden hohen Gehaltes an Chloriden bei Herstellung einer Silbernitratlösung zu vermeiden, da sonst eine mehr oder minder starke Trübung durch ausfallendes Silberchlorid stört. Im Interesse einer klaren und sauberen

Reaktion ist es auch geboten, die Daphnien für einige Zeit in ein Gefäß mit destilliertem Wasser zu bringen und erst von hier aus sie der Silbernitratlösung zuzusetzen. Die Konzentration der anzuwendenden Lösung ist belanglos, sofern sie sich nur um einige Hundertstel Prozent (min. ca. 0,001 % bis max. ca. 0,05 %) bewegt. Ich verwendete am meisten eine 0,01 proz. Lösung. Der Einfluß der Konzentration äußert sich lediglich in der verschiedenen Lebensdauer der Daphnien im AgNO_3 , bzw. im verschiedenen raschen Abschluß des Versuches.

Ein Unterschied im Einfluß von Licht oder Dunkelheit, worauf man bekanntlich beim Arbeiten mit Silbersalzen öfters zu achten hat, ist wohl wegen der kurzen Einwirkungszeit bis zum Eintritt des gewünschten Reduktionsgrades nicht zu bemerken. Aus dem gleichen Grund können auch individuelle Verschiedenheiten, wie sie durch Material von verschiedenen Standorten, verschiedenen Alters oder zu verschiedener Jahreszeit gesammelt, vorkommen, nicht in dem Maße hervortreten, daß sie das Gleichförmige folgender Erscheinung stören würden:

Beobachtet man die in einer Uhrschale mit AgNO_3 -Lösung befindlichen Daphnien gegen einen dunklen Hintergrund, so heben sich schon nach etwa einer Minute die Kiemensäckchen als mit freiem Auge sichtbare, weißlich-opake Ballen ab. Wenige Minuten später, verschieden je nach der Anwendung der Konzentration, sinken die Daphnien nach taumelnden Bewegungen zu Boden und führen mit ihren Ruderantennen nur mehr ruckartige Schläge aus. Werden in diesem Stadium die Daphnien wieder in reines Wasser übertragen und im mikroskopischen Präparat genauer betrachtet, so erweisen sich sämtliche innere Organe als intakt, das Herz arbeitet in unverändertem Rhythmus fort, welcher Zustand sich bis eine Stunde lang erhalten kann. Von einer nach Analogie zu Molisch's Methode bei Pflanzen erwarteten Schwärzung der oft so regelmäßig gefeldert auftretenden Verkalkung des Panzers ist in diesem Stadium auch nicht die geringste Andeutung zu bemerken, wohl aber sind die Kiemensäckchen bei Beobachtung im durchfallenden Lichte intensiv schwarz, im auffallenden Lichte rein weiß. Die Schwärzung durch reduziertes Ag ist derart scharf lokalisiert, daß sich die bei Daphnia in fünf Paaren vorhandenen Kiemensäckchen nach Form, Größe und Lage mit aller nur wünschenswerten Klarheit durch den Panzer oder den oft reichlich ausgebildeten Fettkörper von allen anderen Anhängen der Schwimmpfüße abheben.

Wird der Fortgang der Reduktion vom Beginne ab an verschiedenen Präparaten vergleichend verfolgt, so zeigt sich weiter, daß sich die zweierlei Epithelzellen der Kiemensäckchen (Fiedler P. 6, pag. 495) in so verschiedenem Grade an der Reduktion beteiligen, daß bei gelungenen Präparaten und einiger Erfahrung

eine fast glatte Sonderung der beiden Zellarten erreicht werden kann. Wenn später nach dem Absterben der Daphnia sich das Epithel von seiner feinen Cuticula abhebt, so sieht man diese als zartes, meist gar nicht oder bei längerer Versuchsdauer nur leicht gebräuntes Häutchen liegen. Bei längerer, halbstündiger bis tagelanger Einwirkung der AgNO_3 -Lösung kommt es zu einer ausgiebigen Bräunung oder Schwärzung verschiedener Zellen des ganzen Tierkörpers — namentlich bei Lichtzutritt — und ferner läßt sich auch jene lokale, intensive Schwärzung der verkalkten Membranskulptur erreichen, auf die es in den ersten Versuchen abgesehen war. Diese und andere Beobachtungen liegen aber außerhalb des Rahmens vorliegender Mitteilung und sollen anderenorts im Zusammenhang erörtert werden.

II.

Die eben beschriebene Erscheinung als solche und weitere, davon ausgehende Beobachtungen dürften aus folgenden Gründen beachtenswert sein:

1. Die Methode der Behandlung lebender Daphnien mit einer verdünnten Silbernitratlösung erlaubt eine einfache, verlässliche und überaus anschauliche Darstellung der Kiemensäckchen *in vivo*, was bei einem in verschiedenen Kursen und Demonstrationen so ausgiebig verwendeten Material im Interesse des klaren Verständnisses für den Bau eines typischen, planktonisch lebenden Phyllopoden vielleicht des öfteren erwünscht ist. Dauerpräparate lassen sich nach einer einfachen, später angeführten Methode ebenfalls leicht herstellen. Gerade die zarten Kiemensäckchen sind bei Lebendbeobachtung von Daphnien wenig auffallend, da sie durch das lebhafte Spiel der Beine einer ruhigen Betrachtung schwerer zugänglich sind, und sich mit keiner der üblichen histologischen Methoden spezifisch und so markant ausfärben lassen.

2. Es hat sich auch ergeben, daß die lokalisierte Reduktion nicht nur bei Verwendung von Silbernitrat eintritt, sondern auch mit anderen Metallsalzen und besonders hübsch mit Kaliumpermanganat KMnO_4 gelingt. Natürlich wird man sinnfällig und ohne weitere Nachbehandlung der Daphnien am lebenden Objekt nur dann die stattgefundene Reduktion erkennen, wenn das erste Reaktionsprodukt irgendwie gefärbt ist. Durch Behandeln der Daphnien mit dem so billigen und ungiftigen Kaliumpermanganat als schwache, rosenrote Lösung ist ein noch bequemerer Hilfsmittel zur Darstellung der Kiemensäckchen gegeben, die sich damit ockerbraun bis tief braunschwarz tingieren lassen. Die Möglichkeit, an Stelle von AgNO_3 andere Metallsalze mit Erfolg anzuwenden, lag nach Molisch's Erfahrungen gewiß nahe.

3. Vergleicht man das Ergebnis von Versuchen mit Vitalfärbung und der Aufnahme von Cu-, Fe-, Co- und Pb-salzen mit der unter den gleichen Bedingungen erfolgenden Silberreduktion, so zeigt sich, daß es sich keineswegs um eine bloße Speicherung handelt, sondern um aktive Reduktion von Salzen, die leicht reduzierbar sind.

4. Die Fähigkeit der lokalen Reduktion ist im lebenden Gewebe der Kiemensäckchen am stärksten und kann durch Zerstören des vorhandenen Reduktors gänzlich aufgehoben werden, so daß keinerlei Unterschiede dem übrigen Körperepithel und dem Gewebe der einzelnen Organe gegenüber mehr nachweisbar sind. So bleibt nach Einwirkung von Fixierungsflüssigkeiten wie Pikrinsäure — wässrig und alkoholisch — nach Alkohol mit oder ohne Zusatz von Essigsäure oder Sublimat, nach Anwendung von Flemmings Fixierungsgemisch etc. die lokalisierte und spezifische Reduktion von AgNO_3 oder KMnO_4 aus, wenn das Objekt nach dem Auswaschen mit destilliertem Wasser in die Lösungen übertragen wird. Nur bei Daphnien, die durch heißes Wasser von knapp 45°C abgetötet werden, bleibt die Reduktionsfähigkeit einige Zeit nachher fast unverändert erhalten, wenn die abgetöteten Tiere nur wenige Minuten in reinem Wasser belassen werden. Damit ist ein deutlicher Hinweis für das Vorhandensein eines bis 45° thermostabilen Reduktors in den Epithelzellen gegeben.

5. Außerdem zeigt die direkte Beobachtung, daß die Reduktion im Innern der Epithelzellen erfolgt und sich somit von der bloßen Schwärzung und dem markanten Hervortreten der Zellkontouren, Zellkerne etc., wie sie bei andern Epithelzellen durch die üblichen „Silbermethoden“ bekannt sind, unterscheidet. (Lee-Mayer 11, Kapitel Silber und Epithel.) Diese mit so vorzüglichem Erfolg in der Histologie angewendeten Versilberungsmethoden — über die chemischen Vorgänge, die sich dabei abspielen, sind die Meinungen recht verschieden (siehe Ehrlich, Enzyklopädie, 5) — zeigen manches Besondere, auf das hier nicht weiter Rücksicht genommen werden soll, da in unserem Falle nur die ersten Stadien der Reduktion in Betracht kommen.

6. Verfolgt man durch Vergleich verschieden alter Tiere, die in meinem Falle durchgehends aus Sommeriern stammten, die allmähliche Ausbildung der lokalen Reduktionsfähigkeit, so zeigt sich eine zunehmende Reduktionsstärke des Kiemenepithels in dem Maße als der Gasaustausch der heranwachsenden Daphnie auf diese Organe in erster Linie übertragen wird. Durch die lokale Silberreduktion ist somit auch der wichtigste Ort des Gasaustausches aufzuzeigen.

7. Daphnien, deren Kiemensäckchen nach erfolgter ausgiebiger Reduktion des AgNO_3 oder KMnO_4 außer Funktion gesetzt werden, sterben nach mehr oder minder langer Zeit unter den gleichen Erscheinungen, wie sie auch Sauerstoffmangel hervorruft. Zur Zeit der erfolgten Schwärzung der Kiemensäckchen ist im lebenden Objekt nach gründlichem Abspülen Silber mikrochemisch nicht nachweisbar, somit ein Absterben der Tiere nicht durch die Wirkung der hochgradig giftigen, weil Eiweiß fällenden, Ag-Ionen zu erklären. Anderes gilt für die Ionen von Gold, Eisen, Kupfer, Blei oder Osmiumtetroxyd.

8. Die verschiedene Reduktionskraft der zweierlei Epithelzellen des Kiemensäckchens zeigt ferner ihre physiologische Differenzierung an die sich bei weitem nicht so klar in ihrer morphologischen und zytologischen Verschiedenheit ausprägt.

9. Bei Anwendung der geeigneten Konzentration und der richtigen Zeitdauer der Einwirkung der Silberlösung kann die lokalisierte Schwärzung nicht nur von der späteren Darstellung der verkalkten Partien durch ebenfalls eintretende Schwärzung getrennt werden, sondern auch als mikrochemische Hilfsreaktion im Dienste physiologischer Fragen verwertet werden.

Zu diesen einzelnen Punkten möchte ich als Diskussion noch folgendes weiter ausführen:

III.

Aus dem Vorstehenden dürfte sich wohl ergeben, daß das Hauptgewicht auf die *in vivo* erfolgte Reduktion von Silbernitrat als Methode zur einfachen und spezifischen Darstellung der Kiemensäckchen von *Daphnia* zu legen ist. Besonders gelungene Präparate können als Dauerpräparate ohne weiteres erhalten werden, da bei nachträglichem Fixieren und Auswaschen das typische Bild kaum beeinträchtigt wird. Einbetten in Glycerin-gelatine kann den Weg zu instruktiven Dauerpräparaten bedeutend abkürzen, da man nach dem Auswaschen in Wasser nur allmählich durch Eindunstenlassen einer verdünnten Glycerinlösung stärker konzentrierteres Glycerin zu passieren hat. Anders gefärbte Kiemensäckchen sind als Dauerpräparat nach folgender Methode zu gewinnen:

Das Silbernitrat oben angegebener Konzentration wird gleich in einer alkoholischen etwa 5% Lösung mit Zusatz von Glycerin hergestellt, die Daphnien aus destilliertem Wasser dann übertragen und das Ganze dem Lichte ausgesetzt. Sind die Tiere knapp vor dem Absterben — mikroskopische Kontrolle — so werden sie in destilliertes Wasser überführt, kommen von hier aus in stärkeres Glycerin und werden weiter belichtet. Die Ge-

webe ausser den Kiemensäckchen werden dabei wohl geschädigt, aber recht durchsichtig und die nun intensiv und leuchtend rot gefärbten Kiemensäckchen heben sich sehr scharf ab. Der Farbbenton und die vollkommen homogene Färbung lassen auf eingelagertes Silber in kolloidaler Form schließen, wobei ich noch bemerke, daß auch die Schwärzung *in vivo* stets homogen und nie körnelig, bzw. nie an distinkte Granula gebunden ist. Dadurch unterscheidet sich die Silberreduktion von einer Vitalfärbung mit Methylenblau, wobei auch in erster Linie das Epithel der Kiemensäckchen den Farbstoff speichert, doch nur vorübergehend. Wenn die vital durchgefärbten Tiere in reines Wasser zurückkommen, blaßt die Granulafärbung ab.

Obwohl ich die beschriebenen Verhältnisse nur an *Daphnia pulex* de Geer und *D. longispina* Müller eingehend verfolgt habe, so dürfte doch kein Zweifel sein, daß man die Methode mit Erfolg auch bei anderen Cladoceren wird anwenden können. In diesem Falle erlaubt die vitale Schwärzung der Kiemensäckchen nicht nur Form und Größe, sondern auch deren für die systematische Beschreibung wichtige Verteilung an den verschieden geformten Schwimmpfüßen anschaulich demonstrieren zu können. Die wechselnden Verhältnisse, die in den einzelnen Stämmen diesbezüglich auftreten, mögen aus der folgenden Übersicht entnommen werden. (Siehe Keilhack l. 9. und Claus Grobben 2. pag. 469.)

Ctenopoda: *Sida* Straus., *Diaphanosoma* Fischer und *Holopedia* Sars besitzen 6 Paare von Blattfüßen mit wohlentwickelten Kiemensäckchen, während diese bei *Latona* Straus am 6. Fußpaar fehlen.

Anomopoda: Die überwiegende Mehrzahl der hierher gehörigen Gattungen haben 5, von der Schale ganz bedeckte Beinpaare mit Kiemensäckchen; bei *Bosmina* G. O Sars mit 6 Brustfüßen ist jenes am letzten Beinpaar verkümmert. Sehr klein ist ferner das 6. Fußpaar bei *Alona* Baird und *Alonopsis* G. O Sars; die Chidoriden mit 5—6 Brustfüßen haben die vorderen ohne Kiemenanhang.

Onychopoda: Die beiden Vertreter *Polyphemus pediculus* L. und *Bythotrephes longimanus* Leydig besitzen 4 Beinpaare ohne Kiemensäckchen.

Haplopoda: *Leptodora kindtii* Focke als einzige Art hat 6 Beinpaare ohne Kiemensäckchen.

Besonders typische Kiemensäckchen haben unter den Cladoceren also nur die Ctenopoda und Anomopoda, bei denen dieses Organ ein umgewandeltes Epipodit ist. Wie die Verhältnisse bei den Ostracoden liegen, von denen der Maxillarfuß bei den Cypridae eine wohl entwickelte oder reduzierte „Atemplatte“ trägt (Vávra 17, pag. 86.) oder bei Darwinulida *Stevensoni* Br. u.

Rob., bzw. bei Cylindrolebris (Giesbrecht 8, pag. 72.), bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die Methode der Versilberung dürfte nicht nur zur Klärung mancher physiologischer Fragen, beitragen, sondern auch ein brauchbares Hilfsmittel beim Bestimmen der Formen werden.

IV

Bezüglich des Baues der Kiemensäckchen kann ich nach den Untersuchungen von Fiedler (6) nichts wesentlich Neues beitragen. Das Kiemenepithel von *Daphnia* unterscheidet sich durch die Ausbildung zweier verschiedener Zellarten auffallend vom übrigen Körperepithel, namentlich von dem unter dem Panzer gelegenen. (Siehe Claus 1, pag. 370 und Fig. 4, Tafel XXV.) Beide Zellarten sind stark wellig konturiert, haben große, runde Kerne mit meist länglichem Kernkörperchen und heben sich auch am lebenden Objekt durch ihre verschieden orientierten, körnigen bis stäbchenförmigen Inhaltkörper ab. Die einen und zwar größeren Zellen sind dicht damit erfüllt, wobei die „Fasern“ — wie sich Fiedler ausdrückt — ziemlich regelmäßig senkrecht zur äußeren Oberfläche der Zelle gelagert sind, während die dazwischen gelegenen Zellen durch parallel zur welligen Zellkontour streichende Inhaltkörper ausgezeichnet sind. Der von Fiedler erwähnte „breite, helle Interzellularraum, der die Zellen der ersten Art umzieht, wodurch sie sich scharf abheben“, (6. pag. 496) dürfte wohl nur durch die Fixierung so auffällig werden, vielleicht erst gebildet worden sein. Während Fiedler anscheinend nur konserviertes Material prüfte, (pag. 494) zog ich in erster Linie lebendes Material zur Untersuchung heran, an dem ich jedenfalls diesen Interzellularraum nicht vorfand. Ebenso vermisste ich am lebenden Material und gleichfalls an den durch reduziertes Silbernitrat intensiv geschwärzten Kiemensäckchen die „von den Zellen der ersten Art quer durch den Interzellularraum ausgehenden Plasmabrücken, wodurch die Verbindung mit den Nachbarzellen hergestellt wird“ Gerade die Imprägnation mit AgNO_3 wäre zur Darstellung der Plasmabrücken (Plasmodesmen oder Plasmaverbindungen) sehr geeignet: wenn ich trotzdem diese nicht fand, besonders nicht in so klarer Ausbildung wie sie Fiedler in Fig. 1 seiner Arbeit zeichnet, so liegt das sicherlich mit an der verschiedenen Vorbehandlung des Objektes. Die Epithelzellen, besonders die „längs gestreiften“ — wie ich sie hier kurz nennen möchte — sind auch weniger hoch als die zweite Zellart, wenn diese sich in das Innere der Kiemensäckchen bei kräftiger Ausbildung vorwölben. Bei längerer Einwirkung des AgNO_3 treten im Epithel des Panzers die Zellkerne klar hervor, die man sonst am lebenden Objekt nicht so deutlich erkennen kann.

Über die mikrochemische Natur der Inhaltskörper kann ich keine Angaben machen, doch ist bemerkenswert, daß sie sich an der Reduktion nicht beteiligen, durch die Einwirkung von AgNO_3 leicht sich abrunden und dann scharf kontouriert sind. Wie früher erwähnt, erfolgt die Schwärzung im Zellinneren der Epithelzellen, ist nie auf die zarten, trennenden Wände beschränkt oder im Zellkern stärker.

Die beiden Zellformen des Epithels der Kiemensäckchen lassen sich nun durch die lokale Schwärzung mit AgNO_3 weit deutlicher trennen, als es die zytologische Betrachtung erlaubt. Die Hauptorte, und vor allem die ersten Stätten der Reduktion sind die „längs gestreiften“ Zellen, die bei gelungenen Präparaten entweder ausschließlich geschwärzt sind oder stets in einem tieferen Toner erscheinen als die zweite Zellart. Die getrennte Darstellung gelingt mit AgNO_3 und KMnO_3 am besten, dagegen weniger gut oder gar nicht mit AuCl_2 . Ein förmliches Netz von tief dunkel bis rein schwarz gefärbten Zellen breitet sich dann zwischen den weniger tingierten aus, wobei der Unterschied sich erst bei längerer Einwirkung der Lösung ausgleicht. Auffallenderweise ist aber diese Zelldifferenzierung an den durch vermutlich kolloidales Silber rot gefärbten Dauerpräparaten nicht vorhanden. Wie sehr diese Differenzierung an das lebende Objekt gebunden ist, erhellt auch aus Vitalfärbungen mit Methylenblau oder aus dem Vergleich mit abgetöteten, noch reduzierenden Kiemensäckchen. In verdünntem Methylenblau kommt es zu einer gleichmäßigen, doch nach Entfernung der Farbstofflösung vorübergehenden Farbstoffspeicherung, die sich auf Granula beschränkt und selten diffus ist. Das Entfärben aber findet bemerkenswerter Weise in den „längs gestreiften“ Zellen früher statt, was sich ungezwungen aus ihrer größeren, durch die Versuche mit AgNO_3 -reduktion aufzeigbaren Aktivität erklären läßt. Die Übereinstimmung beider Methoden ist jedenfalls frappant, wenn sie auch wegen der weniger sicheren Vitalfärbung erst nach mehreren Versuchen beweisend zu demonstrieren war. Es liegt das sicherlich auch mit an der für Vitalfärbung bedeutend längeren Einwirkungsdauer — das Optimum ist nach 3—5 Stunden erreicht — und an den individuellen Unterschieden, die sie dann leichter bemerkbar machen.

In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich mit den Ergebnissen über Vitalfärbung von Fischel A. (7) interessant, dem wir speziell bei Cladoceren die umfangreichsten und wesentlichsten Erfahrungen verdanken.

Das wichtigste Untersuchungsobjekt von Fischel war *Daphnia magna* und *D. longispina*, die eingehend geprüften Vitalfarbstoffe sind Neutralrot, Neutralviolett, Nilblausulfat, Nilblauchlorhydrat, Bismarckbraun, Methylenblau, Toluidenblau,

diese auch kombiniert angewendet und außerdem Alizarin. Mit Rücksicht auf die Färbung der Kiemensäckchen ist bemerkenswert, daß Methylenblau spezifisch angreift, wobei „die Speicherung des Farbstoffes in bestimmt gelagerten Granulis erfolgt, denselben, die auch durch die beiden schon erwähnten Farbstoffe darstellbar sind“ nämlich Neutralrot und Nilblausulfat. (7 p. 28.) Ferner erhielt F i s c h e l besonders auffällige und sogar organspezifische Färbung der Kiemensäckchen mit Alizarin nach Säure- oder Alkalizusatz, wobei diese Organe, die sich sonst mit Alizarin nicht färben, neben den tiefer tingierten Nerven sich abheben. Doch bemerkt F i s c h e l ausdrücklich, daß „die zulässige Dosis von Alkali eine sehr geringe ist und sie kann leicht überschritten werden. Dann sterben die Tiere rasch ab, jedoch nicht ohne daß die Kiemen gefärbt hervortreten“ (pag. 52) und weiter, daß es „nicht ohne Interesse ist, daß die mit HCl-Alizarin erzielbare, spezifische Färbung der Kiemenlappen manchmal auch bei Anwendung reiner Alizarinlösungen eintritt, — aber nur bei Tieren, die entweder schon abgestorben oder im Absterben begriffen sind“ (pag. 56). Mit KOH-Alizarin und HCl-Alizarin gelang F i s c h e l der interessante Nachweis, „daß wir an den Kiemen — bzw. an ihren Oberflächen — zwei chemisch scharf von einander unterschiedene A b s c h n i t t e zu unterscheiden haben, denen wohl auch funktionelle Unterschiede entsprechen. Nach dem Färbungsgrad zu schließen, scheint dieser Unterschied an den zwei vordersten Kiemen am schärfsten ausgeprägt zu sein“ (pag. 55). Das gilt aber nur für die vier vorderen Kiemen von *Daphnia longispina*, die fünften Kiemen haben diese speziellen Zonen nicht. Mit HCl-, bzw. KOH-Alizarin lassen sich diese differenten Zonen gesondert darstellen, und zwar charakteristisch entweder nur bei saurer oder nur basischer Reaktion. (pag. 55.) Die Vitalfärbung mit Methylenblau ermöglicht diese Differenzierung nicht, ebensowenig ein anderer Farbstoff für sich oder in Kombination mit anderen.

Was mir an F i s c h e l s Angaben auffällt, ist Folgendes:

1. Abgesehen von der einzigen Bemerkung, daß „im Bereiche der Kiemenabschnitte an den 2., 3. und 4. Kiemen oft eine Anzahl unregelmäßig verlaufender dunkelvioletter Linien (Fig. 5) auftreten, durch welche eine Felderung der Kiemenoberfläche entsteht“ (pag. 54), findet sich nirgends eine Beobachtung über die Unterscheidung der zweierlei Epithelzellen des Kiemensäckchens. Ebensowenig ist eine solche aus der Fig. 8 zu ersehen, die einen Mikrotomschnitt durch die dritte Kieme von *Daphnia magna* zeigt, das gleiche Objekt, das F i e d l e r sehr klare Bilder lieferte und welche „eigentümlich verästigte Figuren“ L e y d i g auch für *Daphnia sima* zeichnet (10, Fig. 12. Tafel 1.) und C l a u s (1) ebenfalls als „unregelmäßig dendritische Figuren“ (pag. 370) er-

kannte. Daß auch eine cytologische Sonderung auffällt und deren genaue Charakteristik möglich ist, kann ich durch eigene Beobachtungen am lebenden Objekt und mit einigen, durch die verschiedene Vorbehandlung des Materials bedingten Einschränkungen der Angaben von Fiedler bestätigen. Gerade die Versilberung zeigt darin gegenüber der Vitalfärbung und der lokalen Speicherung von KOH- und HCl-Alizarin eine entschiedene Überlegenheit und führt zu einer bisher unbekanntem Differenzierung der Zellarten in zwei chemisch unterscheidbare und auch wohl physiologisch differente Zellen des Epithels. Besonders klar ist das im 3. und 4. Fußpaar.

2. Hat Fischel anscheinend wenig oder gar kein Gewicht auf die Beobachtung der oft ziemlich raschen Entfärbung nach Methylenblauspeicherung gelegt, die ebenfalls wieder die verschiedenen Zellarten auseinanderhalten läßt. Individuelle Unterschiede spielen dabei eine ziemliche Rolle, wie ich überhaupt in Übereinstimmung mit Fischel wohl an der überwiegenden Mehrzahl der Individuen schöne Granulafärbung erzielte, aber im Grade und der Schnelligkeit des Eintretens klarer Bilder, ebenso an den einzelnen Tieren beträchtliche Unterschiede und Schwankungen vorfand. Im Vergleich mit der Reduktion der AgNO_3 -Lösung oder der von KMnO_4 zur vitalen Methylenblauspeicherung ist die größere Präzision und die wegen der kurzen Versuchsdauer individuelle Unterschiede fast ganz ausgleichende Versilberung ein entschiedener Vorteil. Die ungleich rasche Entfärbung, in manchen Fällen auch die direkt beobachtete Auffärbung der zweierlei Epithelzellen, scheint mir in Analogie zu Ehrlichs' Versuchen (4) durch das verschiedene Sauerstoffbedürfnis am einfachsten erklärt, umso mehr, als die Kiemen-säckchen als Respirationsorgane wohl ohne Einschränkung in erster Linie in Betracht kommen. Wie der Reduktor der Zelle arbeitet, welcher Stoff im Speziellen in Betracht käme und weitere Fragen diesbezüglich, müssen vorläufig offen bleiben.

3. Gegenüber der Vitalfärbung, die an distinkte Granula gebunden ist und nur selten auch diffus eintritt, ist die AgNO_3 -reduktion stets diffus im Innern und nicht an besondere, geformte Inhaltskörper gebunden. Hier ergänzt also die Vitalfärbung das Bild der Ag-schwärzung, die eine so augenfällige Darstellung protoplasmatischer Anteile nicht gestattet. In einem andern Falle, den ich hier aus der Botanik entnommen, einschalte, zeigt aber die Versilberung solche, sonst kaum wahrnehmbare und meist übersehene Inhaltskörper auf. Die weitgehend rückgebildeten Chloroplasten der Epidermiszellen höherer Pflanzen, der Mono- und Diktotyledonen, sind nach Molischs Methode der Versilberung so distinkt hervorzuheben, wie es in diesem Falle eine Vitalfärbung nicht erlaubt, da sie meist gar nicht anwendbar ist. (Molisch, 14.)

4. Ganz in Übereinstimmung mit F i s c h e l sind eigene Befunde über die Form der Kiemen der verschiedenen Beinpaare, besonders über die abweichende Gestaltung bei jungen Tieren. Bei letzteren erwähnt F i s c h e l nicht weiter, daß sie sich bei Vitalfärbung anders verhielten als erwachsene Daphnien. Die Versilberungsversuche an ganz jungen Daphnien lieferten mir Bilder, aus denen unzweifelhaft hervorgeht, daß die Reduktionskraft der fertigen Kiemen stärker ist und die lokale Schwärzung mit zunehmenden Funktionsansprüchen auch rascher eintritt. Die Möglichkeit, sowohl durch Vitalfärbung als die spezifische Silberreduktion klarer die Form, Entwicklung und Umbildung der Kiemensäckchen an einer Spezies und auch vergleichend bei verwandten Formen verfolgen zu können, kann hier leicht über manche Fragen Aufklärung geben. F i s c h e l war der Erste, der präzise die Kiemen nach spezifischer Färbung am lebenden Objekt erkennen konnte und außer seinen Bildern sind die in Lehr- und Handbüchern gebrachten Figuren und Cladoceren in diesem Punkte meist ungenau oder direkt falsch.

5. Die von F i s c h e l erzielten Zonen am Kiemensäckchen bei saurerer oder basischer Alizarinfärbung können mit der Silbermethode nicht gefunden werden. Diese, nur mit Alizarin nachweisbare, regionale Differenz an einem Organ, die an den zwei vordersten Kiemen am markantesten ist, dürfte wohl ein ebenso schönes als anspornendes Beispiel sein, die mikrochemische Methode, — wozu man füglich die Vitalfärbung auch rechnen kann — ausgiebiger im Dienste physiologischer Probleme zu verwerten.

Im Ganzen genommen ist somit die Vitalfärbung und die Methode der lokalen AgNO_3 -reduktion darin übereinstimmend, daß sie zur Aufdeckung von Organdifferenzen, bzw. auch Zelldifferenzen führt, die sonst unerkannt geblieben wären, was umsomehr Beachtung verdient, als sich die Vorgänge am lebenden Objekt demonstrieren lassen. Trotz mancher gemeinsamer Erscheinungen hat aber jede der Methoden ihre Besonderheiten und man wird sie mit Erfolg nebeneinander verwerten. Durch die größere Schärfe der Bilder, das rasche Arbeiten und die Möglichkeit der dauernden Erhaltung gelungener Präparate wird aber die Silbermethode, namentlich für morphologische und vergleichende Studien vorteilhafter sein.

VI.

Die Kiemensäckchen der Cladoceren werden wohl allgemein als Respirationsorgane angesprochen und gerade in dieser Frage kann die Methode der lokalen Silberreduktion einige Aufklärung geben. Ganz allgemein dürfte für die niederen Crustaceen mit

kannte. Daß auch eine cytologische Sonderung auffällt und deren genaue Charakteristik möglich ist, kann ich durch eigene Beobachtungen am lebenden Objekt und mit einigen, durch die verschiedene Vorbehandlung des Materials bedingten Einschränkungen der Angaben von F i e d l e r bestätigen. Gerade die Versilberung zeigt darin gegenüber der Vitalfärbung und der lokalen Speicherung von KOH- und HCl-Alizarin eine entschiedene Überlegenheit und führt zu einer bisher unbekanntem Differenzierung der Zellarten in zwei chemisch unterscheidbare und auch wohl physiologisch differente Zellen des Epithels. Besonders klar ist das im 3. und 4. Fußpaar.

2. Hat F i s c h e l anscheinend wenig oder gar kein Gewicht auf die Beobachtung der oft ziemlich raschen E n t f ä r b u n g nach Methylenblauspeicherung gelegt, die ebenfalls wieder die verschiedenen Zellarten auseinanderhalten läßt. Individuelle Unterschiede spielen dabei eine ziemliche Rolle, wie ich überhaupt in Übereinstimmung mit F i s c h e l wohl an der überwiegenden Mehrzahl der Individuen schöne Granulafärbung erzielte, aber im Grade und der Schnelligkeit des Eintretens klarer Bilder, ebenso an den einzelnen Tieren beträchtliche Unterschiede und Schwankungen vorfand. Im Vergleich mit der Reduktion der AgNO_3 -Lösung oder der von KMnO_4 zur vitalen Methylenblauspeicherung ist die größere Präzision und die wegen der kurzen Versuchsdauer individuelle Unterschiede fast ganz ausgleichende Versilberung ein entschiedener Vorteil. Die ungleich rasche Entfärbung, in manchen Fällen auch die direkt beobachtete Auffärbung der zweierlei Epithelzellen, scheint mir in Analogie zu E h r l i c h s' Versuchen (4) durch das verschiedene Sauerstoffbedürfnis am einfachsten erklärt, umso mehr, als die Kiemensäckchen als Respirationsorgane wohl ohne Einschränkung in erster Linie in Betracht kommen. Wie der Reduktor der Zelle arbeitet, welcher Stoff im Speziellen in Betracht käme und weitere Fragen diesbezüglich, müssen vorläufig offen bleiben.

3. Gegenüber der Vitalfärbung, die an distinkte Granula gebunden ist und nur selten auch diffus eintritt, ist die AgNO_3 -reduktion stets diffus im Innern und nicht an besondere, geformte Inhaltskörper gebunden. Hier ergänzt also die Vitalfärbung das Bild der Ag-schwärzung, die eine so augenfällige Darstellung protoplasmatischer Anteile nicht gestattet. In einem andern Falle, den ich hier aus der Botanik entnommen, einschalte, zeigt aber die Versilberung solche, sonst kaum wahrnehmbare und meist übersehene Inhaltskörper auf. Die weitgehend rückgebildeten Chloroplasten der Epidermiszellen höherer Pflanzen, der Mono- und Diktotyledonen, sind nach M o l i s c h s Methode der Versilberung so distinkt hervorzuheben, wie es in diesem Falle eine Vitalfärbung nicht erlaubt, da sie meist gar nicht anwendbar ist. (M o l i s c h, 14.)

4. Ganz in Übereinstimmung mit F i s c h e l sind eigene Befunde über die Form der Kiemen der verschiedenen Beinpaare, besonders über die abweichende Gestaltung bei jungen Tieren. Bei letzteren erwähnt F i s c h e l nicht weiter, daß sie sich bei Vitalfärbung anders verhielten als erwachsene Daphnien. Die Versilberungsversuche an ganz jungen Daphnien lieferten mir Bilder, aus denen unzweifelhaft hervorgeht, daß die Reduktionskraft der fertigen Kiemen stärker ist und die lokale Schwärzung mit zunehmenden Funktionsansprüchen auch rascher eintritt. Die Möglichkeit, sowohl durch Vitalfärbung als die spezifische Silberreduktion klarer die Form, Entwicklung und Umbildung der Kiemensäckchen an einer Spezies und auch vergleichend bei verwandten Formen verfolgen zu können, kann hier leicht über manche Fragen Aufklärung geben. F i s c h e l war der Erste, der präzise die Kiemen nach spezifischer Färbung am lebenden Objekt erkennen konnte und außer seinen Bildern sind die in Lehr- und Handbüchern gebrachten Figuren und Cladoceren in diesem Punkte meist ungenau oder direkt falsch.

5. Die von F i s c h e l erzielten Zonen am Kiemensäckchen bei saurerer oder basischer Alizarinfärbung können mit der Silbermethode nicht gefunden werden. Diese, nur mit Alizarin nachweisbare, regionale Differenz an einem Organ, die an den zwei vordersten Kiemen am markantesten ist, dürfte wohl ein ebenso schönes als anspornendes Beispiel sein, die mikrochemische Methode, — wozu man füglich die Vitalfärbung auch rechnen kann — ausgiebiger im Dienste physiologischer Probleme zu verwerten.

Im Ganzen genommen ist somit die Vitalfärbung und die Methode der lokalen AgNO_3 -reduktion darin übereinstimmend, daß sie zur Aufdeckung von Organdifferenzen, bzw. auch Zelldifferenzen führt, die sonst unerkannt geblieben wären, was umsomehr Beachtung verdient, als sich die Vorgänge am lebenden Objekt demonstrieren lassen. Trotz mancher gemeinsamer Erscheinungen hat aber jede der Methoden ihre Besonderheiten und man wird sie mit Erfolg nebeneinander verwerten. Durch die größere Schärfe der Bilder, das rasche Arbeiten und die Möglichkeit der dauernden Erhaltung gelungener Präparate wird aber die Silbermethode, namentlich für morphologische und vergleichende Studien vorteilhafter sein.

VI.

Die Kiemensäckchen der Cladoceren werden wohl allgemein als Respirationsorgane angesprochen und gerade in dieser Frage kann die Methode der lokalen Silberreduktion einige Aufklärung geben. Ganz allgemein dürfte für die niederen Crustaceen mit

Recht das ganze Integument der Körperoberfläche als primitives Respirationsorgan gelten, wobei auch dem Darm der Cladoceren die gleiche Funktion zukommen soll. (Siehe Giesbrecht 8, pag. 66—67 und Winterstein 18, pag. 91.) Bei Formen mit wohl ausgebildeten Kiemenanhängen wird sicherlich der Gasaustausch, und vielleicht auch teilweise die Aufnahme gelöster Stoffe, hier in ausgiebigem Maße lokalisiert, wozu diese Organe durch ihre Lage, ihren Bau, ihre mit zarter Cuticula vom umgebenden Medium getrennten Epithelzellen hervorragend geeignet sein müssen. Trotz der Formenmannigfaltigkeit ist ein der Funktion angepaßter, einheitlicher Zug in der Ausbildung der Kiemen sofort klar ersichtlich. Gerade die Befunde über die spezifische Reduktionswirkung lieferten den sinnfälligen Beweis, wie ein Teil der respiratorischen Funktion auf diese Organe übertragen ist. Die lebhafte Reduktionswirkung der Epithelzellen der Kiemensäckchen ist ein Ausdruck ihrer erhöhten und spezifischen Leistungen und Lebenstätigkeit. Nun ist aber die Versilberung zweifellos von einem allmählichen Abtöten der Zellen durch die Eiweiß fällende Wirkung der Ag-Ionen begleitet, ohne daß das Tier unmittelbar danach schon absterben würde. Der fort dauernde Herzschlag und die Bewegungen der lebhaft arbeitenden Muskeln zeigen, daß außer seitens der Kiemensäckchen die respiratorische Funktion, wenigstens eine Zeitlang, in ausgiebigem Maße aufrecht erhalten bleibt. Dieses bis zu einer Stunde dauernde Überleben der inneren Organe läßt auf eine zweite Art der Respiration schließen, für welche entweder das ganze äußere Integument der zarten Tiere in Betracht kommt oder die innere Oberfläche des großen Darmtraktes. — Bisher ist die Annahme einer respiratorischen Funktion des Darmes auf die Beobachtungen der Kontraktionen, die mit Wasseraufnahme verbunden sind, gestützt (Winterstein 18. p. 91—92) oder auf die Erfahrungen mit Farbstofflösungen, die nicht durch osmotische Aufnahme seitens des Integumentes über den Umweg der Körperflüssigkeit, sondern durch direktes Einsaugen bei den Kontraktionen ins Darmlumen gelangen. Daß von hier aus ein Durchtritt ins Körperinnere zu den übrigen Geweben möglich ist, zeigen eben die Vitalfärbungsversuche. Prüft man nach eingetretener Schwärzung der Kiemen einer Daphnia und nach vorherigem, sehr sorgfältigem Abwaschen mit destilliertem Wasser, ob in den Geweben oder der Leibeshöhle sich Silber als Silberchlorid oder Silberoxalat nachweisen läßt, so fällt die Reaktion negativ aus. Wird eine mit geschwärzten Kiemen versehene Daphnie in Leitungswasser zurückgebracht, so tritt nach dem Absterben später keinerlei Bräunung oder Schwärzung ein, die sich einstellen würde, wenn namhafte Mengen von AgNO_3 im Körper wären. Wie stark die Speicherung sein kann, geht aus der sehr raschen Bräunung fixierter oder durch heißes Wasser ge-

töteter Daphnien in AgNO_3 hervor. Hält man also die drei Tatsachen a) Überleben nach „physiologisch ausgeschalteten“ Kiemensäckchen, b) Fehlen von Ag im Körper und c) unverminderte Herz- und Muskeltätigkeit zusammen, so dürfte man wohl einen Hinweis — um nicht zu sagen Beweis — auf die Nebenfunktion des Darmes und Integumentes als Respirationsorgan sehen. Als Methode zum lokalen Abtöten und außer-Funktion-setzen der Kiemensäckchen wird die Versilberung noch für manche Frage brauchbare Dienste leisten können.

VII.

Die Ergebnisse der Versuche mit Kaliumpermanganat decken sich ganz mit jenen der Einwirkung von Silbernitrat, so daß ich nicht weiter darauf eingehe. Ich habe auch bald die Anwendung von Osmiumsäure, Gold-, Rubidium- und Platinchlorid aufgegeben, da sie weniger prägnante Bilder liefern und schon in schwächsten Konzentrationen stark schädigen. Die Metallsalze: Kupferchlorid und -sulfat, Kobaltchlorür, Eisennitrat, Kaliumbichromat, Bleinitrat und -azetat sind noch viel weniger geeignet und bei ihrer Wirkung handelt es sich vor allem um Speicherungen oder Fällungen und nicht um aktive Reduktionen. Außerdem ist es notwendig, die gefärbten Sulfide durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff erst zu bilden und man wird selbst dann nicht die schönen Bilder, wie sie AgNO_3 gibt, erzielen. Trotzdem sind mir auch dabei einige sehr auffällige Erscheinungen untergekommen, die zusammen mit weiter ausgedehnten Untersuchungen über die „Silbermethode“ nach Abschluß anderer Arbeiten fortgeführt werden.

Die vorliegende Untersuchung ist im zoologischen Institut der deutschen Universität in Prag ausgeführt worden. Den Herren Professoren Cori und Wagner Kremsthal sage ich auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank für ihr Interesse an der Arbeit und die beste Unterstützung meiner wissenschaftlichen Bestrebungen.

Prag, Zoolog. Inst., im Jänner 1925.

Literatur.

1. Claus C.: Zur Kenntnis der Organisation und des feineren Baues der Daphniden und verwandten Cladoceren. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 27. 1876.
2. Claus C.-Grobben K. Lehrbuch der Zoologie. III. Aufl. 1917 Elwerth-Marburg i. H.
3. Czapek Fr. Biochemie der Pflanzen. II. Aufl. Fischer, Jena.
4. Ehrlich P. Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. Deutsche med. Wochenschr. 1886.

5. Enzyklopädie der mikroskopischen Technik v. Ehrlich-Kraus. Die Artikel: Färbungen, Silber, Gold etc.; 2. Aufl.
 6. Fiedler P.: Mitteilungen über das Epithel der Kiemensäckchen von *Daphnia magna* Straus. Zoolg. Anzeiger. Bd. 33. 1908.
 7. Fischel A. Untersuchungen über vitale Färbung an Süßwassertieren, insbesondere bei Cladoceren. Klinkhardt-Leipzig 1908. (Dasselbst weitere Literatur).
 8. Giesbrecht W.: Crustacea. Art. in Lang: Handb. d. Morphol. d. Wirbellosen. Fischer, Jena, IV. Bd., I. u. II. Lieferg. (Besonders Kapitel postorale Gliedmassen u. Respiration).
 9. Keilhack L.: Phyllopoda in Brauer: Die Süßwasserfauna Deutschlands usw. Fischer, Jena 1909. Heft 10.
 10. Leydig Fr.: Naturgeschichte der Daphniden. Tübingen, Verl. Laupp. 1860.
 11. Mayer-Lee: Grundzüge der mikroskopischen Technik. (Besonders die Kapitel Silber, Epithel, Nerven usw.).
 12. Molisch H.: Über das Verhalten der Cystolithen gegen Silber- und andere Metallsalze. Ber. d. Deutschen bot. Ges. 36., Bd. 1918.
 13. Derselbe: Mikrochemie der Pflanze. 2. Aufl. 1921. Fischer, Jena.
 14. Derselbe: Die lokale Reduktion von Silbersalzen im Chloroplasten. Sitzber. d. Akad. d. Wissensch, Wien., naturw. med. Klasse 1918.
 15. Pütter A.: Vergleichende Physiologie. Fischer, Jena 1911.
 16. Solereder: Systematische Anatomie der Dikotyledonen. I. Bd. 1899.
 17. Vávra V. Ostracoda in Brauer: Süßwasserfauna Deutschlands usw. 11. Lieferung.
 18. Winterstein H.: Die physiologisch-chemischen Erscheinungen d. Atmung. Handb. d. vergl. Physiologie. I. Bd. p. 91.
-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Lotos - Zeitschrift fuer Naturwissenschaften](#)

Jahr/Year: 1925

Band/Volume: [73](#)

Autor(en)/Author(s): Gicklhorn Josef

Artikel/Article: [Über spezifische und lokale Reduktion von Silber und anderen Metallsalzen in den Kiemensäckchen von Daphnia M. 83-96](#)