

P. 192
N° 1—5 B I

JANVIER—MAI

1937

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (I)

CRACOVIE
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ
1937



rcin.org.pl

REVUE INTERNATIONALE
DE L'ACADEMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES

Publie, par l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres, sous la direction
de **M. S. Maziarski**, Secrétaire de la Classe des Sciences Mathématiques et
Naturelles (Cracovie, Institut d'Histologie de l'Université, rue Wielopole 15).

Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności.
Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządem Józefa Filipowskiego.

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES ET DES LETTRES
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

1937

*Nowe rośliny permokarbońskich skał w Polsce. I. — New
Plants from the Permocarboiferous Rocks in Poland. I.*

Mémoire

de **M. J. LILPOP,**

présenté le 11 janvier 1937, par M. Wł. Szafer m. t.

(Planche 1).

Introduction

The specimens to be described below, have been collected in the so called Karniowice-limestone of the permocarboiferous age (8). The locality Karniowice is situated about 35 km west of Cracow. The Karniowice-limestone is in reality a layer of calcareous travertine which was secondarily recrystallised and in it plants are embedded in quite a natural position. They are usually preserved as impressions or casts and, when petrified, their anatomical structure is destroyed by the mentioned recrystallisation. That is why polishing gives no adequate results; on thin sections only confuse outlines of organs, exceptionally, also those of tissues are visible.

The flora of that limestone was the object of a study, published in 1891 by M. Raciborski (7), who described and figured 18 species and varieties, belonging to 10 genera. Raciborski's collection, preserved in the Physiographical Museum of the Polish Academy of Sciences, has increased since that time by means of gifts and interesting specimens have been also collected by Mr. E. Panow, geology curator of the Museum. It is the aim of the present author to describe successively those new materials. A specimen, presenting a type of the phylum *Articulatales*, quite unknown to science, is the object of the present paper.

I am very indebted to my colleagues and friends, who have kindly helped me in my work: Miss J. Dąbkowska and Mr.

E. Panow, for their assistance in the very laborious preparation of the specimens, Mr. J. Walas, for the photos, Mr. Z. Bąkowski, for the drawings.

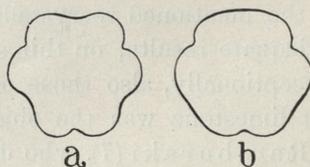
Tristachya Raciborskii nov. gen. & sp.

In the paper cited above, Raciborski described and figured numerous slender stems, bearing superposed, whorled leaves. Because of the characteristic wedge-shape of the leaves and other characteristic features, Raciborski supposed, that they belong to a species of *Sphenophyllum*, which he classified as *S. emarginatum* Brongt. However, he considered that determination as a provisory one, for some details of the shape and venation of the leaves, to be mentioned below, does not agree with *S. emarginatum*. Therefore, Raciborski emphasized, that only the discovery of the fructification could furnish the necessary base for a definitive determination. Now that fructification has been found, but it offers no *Sphenophyllum* character.

Description

In order to give an account of the structure of the entire plant, the description of its vegetative organs will be first presented.

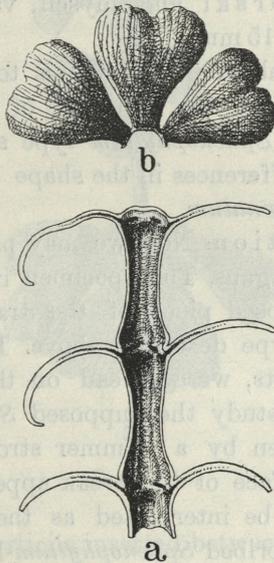
The stems in question, only a few mm broad, are principally triangular in the transverse section (text-fig. 1, b), their walls



Textfig. 1.

being somewhat convex. Only the upper part of the internode appears by thicker shoots sixlateral, because of the leaf traces coming down from the base of each leaf. The typical threelateral structure (text-fig. 1, a) of the thinnest shoots with strongly convex walls, therefore of the young ones, is very similar to Renault's figure of *S. quadrifidum*, reproduced also by D. H. Scott (6). The surface of the impressions of the shoots is covered usually with small crystals of calcite, only in a few cases the crystals

are absent, and then appear delicate, longitudinal ribs, most prominent in the middle part of the internode. The length of the internodes oscillates from 6—40 mm in different shoots. On the same shoot the differences are much smaller; Raciborski noted for inst. the following numbers: 6, 7, 6 or 36, 27, 24 mm. The shoots are characteristically swollen at the nodes. On well preserved specimens one can see distinct, but very fine ribs, coming down from the leaf base and disappearing under the surface of the internode. Those ribs represent undoubtedly leaf traces, the scars of which are distinctly marked on the nodes in the form of small, elliptical holes (text-fig. 2, a). Leaf traces as well as leaf scars are strictly superposed.



Textfig. 2.

The leaves appear usually 6 in one verticil and are superposed; they are rather broad, so that the neighbouring leaves sometimes touch one another. The form of the leaves is characteristically triangular in outline. Their frontal edge is denticulated and bilobed. The lobing can reach about $\frac{1}{5}$ of the length of the leaf, but it may be also more shallow, or — on small leaves — almost completely lacking (text-fig. 2, b, Pl. 1, fig. 8). The frontal edge of both lobes, or of the unlobed leaves, is not straight, as with *S. emar-*

ginatum, but distinctly rounded and obliquely cut at the angles. In both forms of the leaves, *viz.* the entire and the lobed ones, the venation is quite similar. One leaf trace scar on the node corresponds to one leaf. The vascular bundle, entering the base of the leaf, is in its further course the subject of a repeated dichotomy and its ultimate branches reach the edge of the leaf, entering in the single denticules usually singly, or according to Raciborski in pairs. The impressions of the leaves are deep, indicating their cutaneous character. The margin of the leaves is often furled downwards and the leaves appear vaulted (text-fig. 2, b). That is why the denticulation, hidden in the rock, may not be always visible. The length of the leaves, according to the measurements of Raciborski and myself, varies from 7—20 mm, the breadth from 5—15 mm.

The scope of the above description is to show the conformity in all essential points of the structure of the plant in question with the well known *Sphenophyllum* type and to emphasize the small, but constant differences in the shape of the leaves in comparison with *S. emarginatum*.

The fructification. Now we may pass to the description of the reproductive organs. The specimen in question was found in a strongly decomposed piece of the travertine, traversed by many shoots of the type described above. The verticils of leaves, belonging to the shoots, were spread on the surface of the travertine. In order to study the supposed *Sphenophyllum*, a piece of the rock was broken by a hammer stroke so luckily in two parts, that on the surface of the break appeared the longitudinal section of what must be interpreted as the fructification, belonging to the above described *Sphenophyllum*-like shoots. The pieces of travertine have been afterwards examined by means of sectioning and another similar fructification has been found, but in a very bad state of preservation.

The fructification in question consists of superposed verticils of sterile leaflike bracts and sporophyllous cones, standing immediately above them, both inserted at nearly right angles on the central axis (Pl. 1, fig. 1—3 and text-fig. 3). The axis is about 2 mm thick. No finer details of its structure have been preserved. The conebearing axis is less swollen at the nodes, than the vegetative shoot. On the specimen at our disposal are seen 3 verticils of

bracts and cones, the 4-th one is broken off. At the opposite end of the axis are visible indistinct outlines of a verticil of 6 wedge-shaped leaves, growing on a distinctly swollen node (Pl. 1, fig. 1); that verticil, deprived of cones, marks the lower end of the fertile area of the shoot. Its upper end being broken off, it cannot be established, whether the fertile area as a whole was terminal,



Textfig. 3.

or were the fertile verticils inserted between the assimilating leaves. On account of the differences in the structure of the leafy bracts, as compared with the usual assimilating leaves, also on account of their number in the verticil being twice smaller, than that of the assimilating leaves, the first possibility appears more probable.

The length of the internodes, between the cone-bearing nodes, is equal to the length of the bracts and cones, the internode between the leaf- and the cone-bearing verticils, is twice as long. The leafy bracts are quite similar to the assimilating leaves without the lobing mentioned above. The length of the bracts amounts to

12—14 mm, their breadth 6—7 mm. The venation is not preserved well enough to be described accurately; on the surface of two bracts are seen longitudinal ridges, coming down to the base of the bracts. Their character is conform with that of *Sphenophyllum*; traces of the dichotomy may be also seen.

The most interesting part of the fructification in question are certainly the sporophyllous cones which are preserved as deep impressions. They are sessile, elliptical in the longitudinal section, about 14 mm long and 8 mm broad. By means of sectioning and preparing, it has been stated with the necessary certitude that there were three in one verticil. The state of preservation does not allow one to study their structure in details among others because the surface of the impressions was covered with crystalline calcite and yellow ferric matter. Nevertheless, it was possible to observe some characteristic points. The edges of the impressions, as seen in the longitudinal section on the surface of the break, are not smooth, but distinctly alveolate and make the whole organ somewhat grape like (Pl. 1, fig. 1). To each alveolus of the edge corresponds a cavity on the surface of the impression. After careful removal of the small crystals of calcite, those cavities appear as 5—6 lateral fields, separated by distinct ribs (Pl. 1, fig. 5). In the best preserved parts of the impression, in the midst of each field can be seen a small tubercle, representing a cavity on the wall of the corresponding organ. The whole structure is, thus, very similar to the cone of an *Equisetum*. The gelatine cast, made from the described impression (Pl. 1, fig. 4), shows it very well. The 6-lateral cavities of the impression correspond to the apical part of the peltate sporophylles. The sporophylles are regularly disposed in 4 superposed verticils and are alternating in the successive ones. In the median verticils the impressions of 3—4 sporophylles are visible; as the impressions present a little more, than half of the entire cones, there are 6 sporophylles in one verticil. The sporophylles in the verticils at the base and at the top of the cones were less numerous. Their number in the whole cone would thus be no less, than 18 and no more 24. The diameter of the apical part of the sporophylles is about 3 mm.

Discussion and comparison

The first question to be resolved is the mutual appurtenance of the above described plant fragments. The stems and the leaves were often found in direct junction (Pl. 1, fig. 7) and there is no doubt, that they belong to the same plant. There is no such direct evidence as to the fructification. The verticil of leaves at the base of the fructiferous axis is not preserved well enough to furnish such evidence. The proof of the appurtenance of the fructification in question to the described leafy shoots is furnished by the following facts: 1) The leafy bracts of the fructification are similar to the *Sphenophyllum*-like leaves in question. 2) The bracts as well as the cones grow 3 in one verticil, which agrees perfectly with the well known structure of *Sphenophyllum*. 3) Both the leafy shoots and the fructiferous axis have been found embedded in quite a natural position in the same block of travertine, in which besides them only one *Ferne* like leaf fragment is present.

Therefore, the supposition of the appurtenance of the fructiferous axis to *Sphenophyllum*-like, leafy shoots seems to be justified. Consequently, in order to compare the above described plant with other extinct or living plants, we shall take into consideration the characters of both the vegetative and reproductive organs.

The most important, general character of the plant is given by the articulated structure of the shoots and by the verticillate leaves. They both testify that our species belongs to the phylum *Articulatales*. The shape of the leaves and detailed structure of the shoots — as far as it could be made out — presents undoubtedly typical *Sphenophyllum* characters. As to the fructification, it differs greatly from all known *Sphenophyllum* cones, in being much more compound, and also as to the structure of the cones and sporophylles. The cones are not terminal as in *Sphenophyllum*, but whorled. On the contrary, the number of 3 cones forming verticils together with the corresponding bracts agrees with *Sphenophyllum*.

The shape of the sporophylles is peltate and, therefore, is rather similar to the Calamariaceous type. But in our cones are lacking the sterile bracts, characteristic for all Calamarians with the one exception of *Archeocalamites*. D. H. Scott has suggested

the possibility »that they may have occurred in scattered whorls, at long intervals« (6), but also that is not our case.

Among the representatives of the early meozoic *Articulatae*, the reproductive organs in the genus *Phyllothea* alone have been described so as to enable a comparison. They are long, slender cones with verticils of sterile bracts, scattered at long intervals and are, therefore, more similar to *Archeocalamites* than to our plant.

We now come to the type of fructification represented by the living and extinct *Equisetaceae*. Their similarity to the cones of our plant is so striking, that it cannot be denied, although we are confined only to the external shape. They are, just as in *Equisetum*, formed of verticils of sporophylles, which are alternating in the successive whorls. The small number and the dimensions of the sporophylles make our plant nearer to the recent *Equisetum*, than to the extinct *Equisetites*, which possessed more numerous and smaller sporophylles (4).

The fertile strobili of *Equisetum* are usually terminal on the main axis; however, there exist some exceptions to that rule (1), in which strobili are found on lateral branches, independently of that, which terminates the main axis. Forma *polystachya* of *Equisetum silvaticum* L. or *E. maximum* Lam. furnishes an example of that condition, which can be also normal in other species, as for inst. *E. myriochaetum* Cham. (2).

In *Equisetites arenaceus* the cones were, according to Frenzen (3) situated on the top of special, dwarf shoots, growing on the node of the main axis. It is interesting to note, that they grew 3 on one shoot, however, they did not develop simultaneously but one after the other.

Summary

On the basis of the above description, we can say, that the plant in question presents in its vegetative organs and in the manner of the disposition of the cones on the axis, the cardinal characters of *Sphenophyllaceae*, while the structure of the cones and the sporophylles is that of *Equisetaceae*. Therefore, it is impossible to range the plant in one of the known groups of *Articulatales* to which it undoubtedly belongs. Thus, the plant must be ranged as a new genus and species in a special taxonomic group, unknown till now, which I propose to name *Tristachyineae*.

Its place would be near the *Sphenophyllineae* and the *Equisetineae*. Therefore, the *Articulatales* may now be subdivided, as follows: 1) *Protoarticulatineae*, 2) *Pseudobornniineae*, 3) *Sphenophyllineae*, 4) *Cheirostrobineae*, 5) *Tristachyineae* and 6) *Equisetineae*.

The main characters of the *Tristachyineae* are:

Axis articulated. Leaves whorled with radiating and dichotomously divided venation, one leaf trace supplying one leaf. Sporophilous cones to 3 in one verticil. Sporophylles peltate, whorled, alternating in the successive verticils.

Generic and specific diagnosis of *Tristachya Raciborskii* nova genus et species.

Stems articulated, sixangular. Leaves to 6 in one verticil, superposed, wedgedshaped, bilobed, with rounded lobes and denticulated frontal edge. Leafy bracts triangularly ovoid, 3 in one verticil. Sporophilous cones 3 in one verticil. Sporophylles peltate, disposed in 4 verticils on the central axis, alternating.

Elucidation of the restoration of *Tristachya Raciborski*.

Text figure 3 presents the trial of the restoration of *Tristachya Raciborskii*. The shape and the position of the cones and the bracts were made directly after the impression and the cast. The verticil of leaves and the details of the structure of the axis have been completed on the basis of the shoot, figured on Pl. 1, fig. 6, 7, 8 and on other specimens, preserved in the Physiographical Museum.

References

- 1) Bower C. O.: Primitive Land Plants known also as the Archegoniatae. London, 1935. — 2) Engler & Prantl: Natürliche Pflanzenfamilien. I Teil, Abt. 4. Leipzig, 1927. — 3) Frentzen K.: Equisetaceen des germanischen Keupers. Palaeont. Ztng., Bd. 15. Berlin 1933. — 4) Halle Th. G.: Zur Kenntniss der mesozoischen Equisetales Schwedens. K. Svenska Vet. Akad. Handl. Bd. 45. Stockholm, 1908. — 5) Hirmer M.: Handbuch der Paläobotanik. München & Berlin, 1927. — 6) Scott D. H.: Studies in fossil botany. Vol. I. London, 1920. — 7) Raciborski M.: Permokarbońska flora karniowickiego wapienia. Rozpr. Akad. Um. Wydział mat.-przyr. Ser. II, tom I. Kraków, 1891. — 8) Zaręczny St.: Atlas Geologiczny Galicyi, Tekst do zeszytu trzeciego. Wyd. Kom. Fizjogr. Akad. Um. Kraków, 1894.

Explanation of Plate 1

Fig. 1. Impression of the fructification: 3 verticils of bracts and cones; the 4-th verticil at the upper edge of the specimen is broken off. The outlines of a verticil of the assimilating leaves are visible at the base of the axis (nat. size).

Fig. 2. The second face of the same fructification. The two needles are incised in the 3-d cone of both verticils, hidden in the matrix (nat. size).

Fig. 3. Gelatine cast of the impression, fig. 1 (nat. size).

Fig. 4. The central cone at the right hand of the cast with its bract ($\times 2$).

Fig. 5. Part of the wall of the impression of the upper, right hand cone of fig. 1; outlines of the impressions of 3 sporophylles are shown ($\times 2.5$).

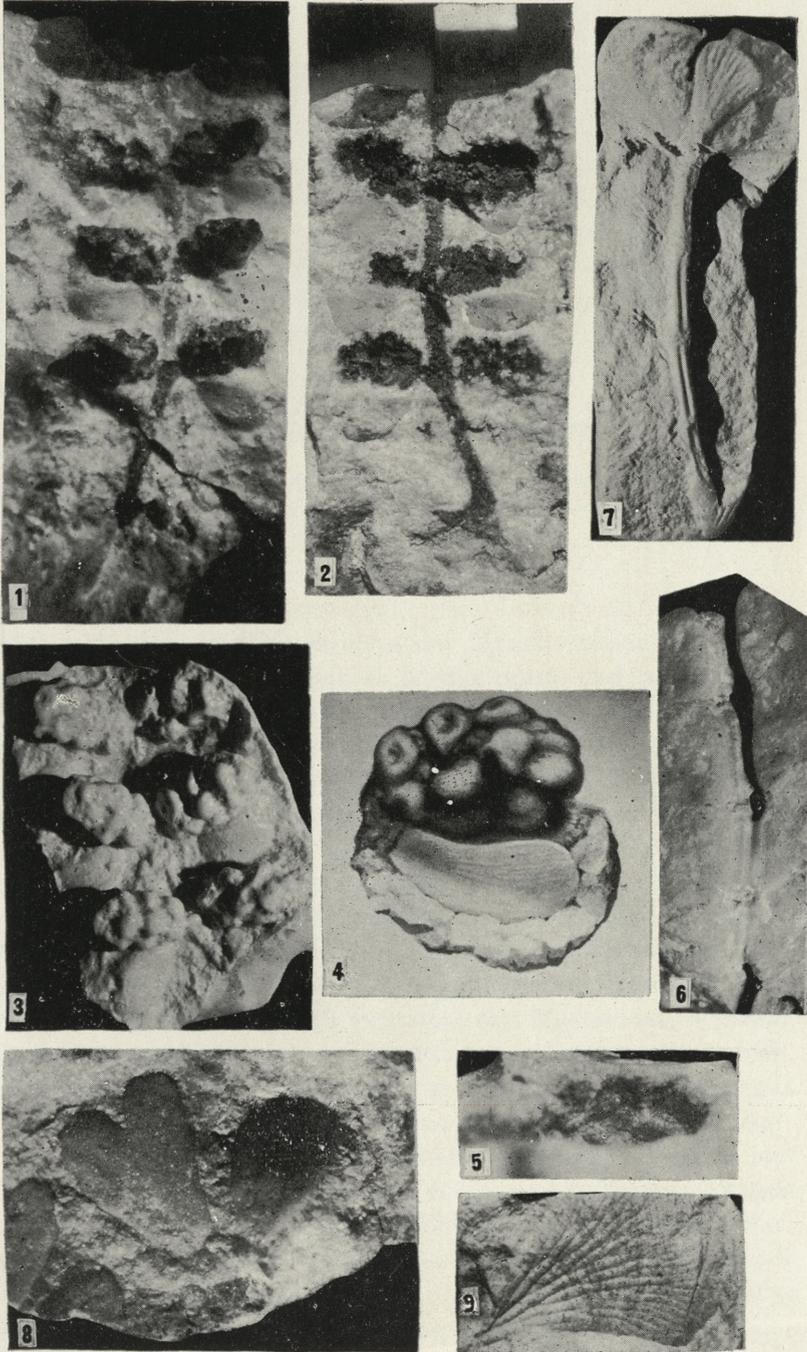
Fig. 6. Impression of a shoot: 4 nodes and outlines of leaf sections are visible ($\times 2$). A part of the same shoot is shown on text-fig. 2.

Fig. 7. Cast of the same impression in order to show the leaves; the upper verticil is on the original impression situated in its natural position, *viz.* at right angle to the axis. The corresponding part of the cast was bent to the level of the shoot ($\times 2$).

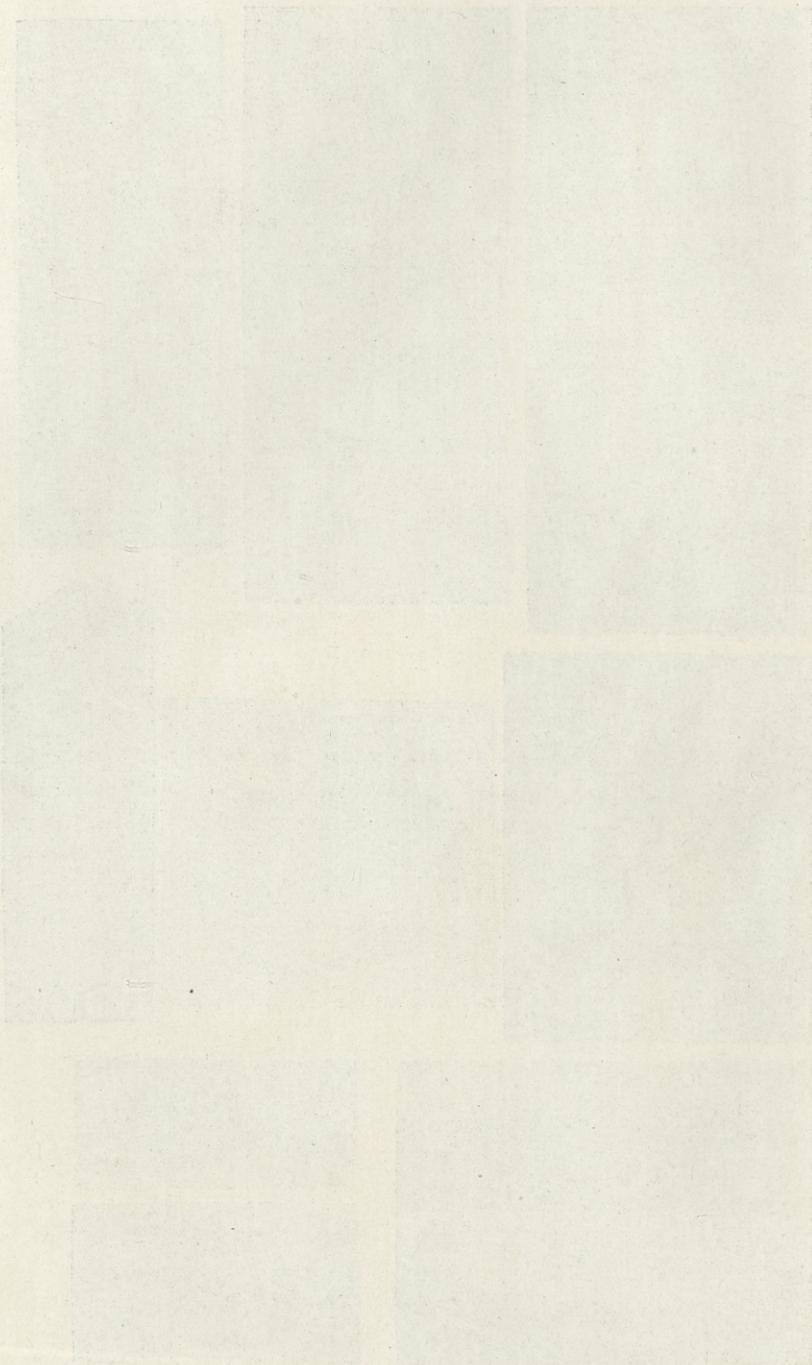
Fig. 8. Part of the verticil of leaves ($\times 2.2$).

Fig. 9. Leaf impression with exactly visible venation ($\times 2$).

All figures, with the exception of fig. 4, are untouched photographs. Fig. 4 is a free-hand design.



J. Lilpop.



*Miksobakterje rozkładające błonnik. — Die zellulosezer-
setzenden Myxobakterien.*

Mémoire

de M^{me} H. et M. S. KRZEMIENIEWSKI,

présenté le 5 avril 1937, par M. S. Krzemieniewski m. c.

(Planches 2—4).

I.

Als man sich der Erforschung der Myxobakterien zuwandte, fand man sie für gewöhnlich in Mistkulturen, und zwar hauptsächlich auf Dung von Pflanzenfressern, seltener auf Baumrinde oder auf faulenden Pilzen und Flechten. Die Untersuchungen der Verfasser vorliegender Arbeit (5) ergaben aber, daß man sie mit Hilfe von sterilisiertem Kaninchenmist aus Erde erhalten kann. Auf diese Weise gelang es außer den meisten bereits bekannten Myxobakterien, auch viele neue Arten zu erhalten.

Es ist jedoch nicht immer gelungen die auf Mist gezogenen Myxobakterien nach Überimpfung weiter zu kultivieren. Nur manche allgemein verbreitete Arten gediehen auf Mistagar oder Kartoffelextrakt. Quehl (10) versuchte den *Myxococcus rubescens* und das *Polyangium fuscum* auf künstlichen Substraten zu züchten. Ihre Kultur auf Mineralnährboden gelang ihm jedoch nur mit Pepton als Stickstoffquelle. Pepton konnte gleichzeitig als Kohlenstoffquelle dienen, eine Zugabe von Glukose neben Pepton förderte die Entwicklung nicht weiter. Auch in den Untersuchungen von Vahle (13) blieb Glukose sowohl wie Stärke in Gegenwart von Pepton ganz bedeutungslos. Bei Anwendung verschiedener anderer Nährböden bemerkte Vahle, daß *Chondromyces crocatus* auf mit Mist- oder Kartoffelabkochung befeuchtetem Filtrierpapier

sich besser entwickelte als auf Gipsplatten mit denselben Extrakten. Einen Verbrauch von Zellulose beobachtete er aber nicht. Mit der Frage nach der Ernährung der Myxobakterien befaßte sich des näheren Jahn (2). Dieser Autor neigt dazu fast alle Arten der Myxobakterien als coprophile Mikroorganismen aufzufassen und hält es nicht für wahrscheinlich, daß es Myxobakterien gibt, die Holz oder reine Zellulose zu zersetzen vermögen. Seine diesbezüglichen Versuche sind alle erfolglos geblieben. Die Zysten von *Melittangium boletus* pflegten zwar in seinen Versuchen auf Filtrierpapier zu keimen, sie kamen aber nie zur vollen Entwicklung. Die vegetativen Stäbchen häuften sich, so wie in reinem Wasser, sofort zu neuen Zysten zusammen. Es halfen weder Mineralnährlösung noch Ammoniumsalze oder Pepton. Jahn erwartete bessere Erfolge mit *Chondromyces aurantiacus*, weil diese Art des öfteren auf Baumrinde oder Holz gefunden wurde, ihr Verhalten auf Fließpapier war aber genau dasselbe und erst ein kleiner Zusatz von Dextrin vermochte ihre volle Entwicklung zu sichern. Diese und ähnliche Versuche anderer Autoren erbrachten den Beweis, daß gemeine Myxobakterien wie: *Myxococcus*, *Archangium*, *Polyangium*, *Melittangium* und *Chondromyces* ungeachtet dessen, daß sie auf Mist gefunden wurden, das an Zellulose reichhaltig ist, die Zellulose nicht unmittelbar verwerten können. Die Zellulose bildet somit in keinem Falle eine diesen Myxobakterien zugängliche Kohlenstoffquelle.

Anders gestaltet sich die Ernährung des von Geitler (1) beschriebenen *Polyangium parasiticum*. Dieser Organismus greift die Membranen der *Cladophora* an und verbraucht den Inhalt ihrer Zellen. Und wiewohl Jahn (3) das *Polyangium parasiticum* für kein Myxobakterium hält, scheint es doch eine Myxobakterie zu sein und den Sorangiaceen anzugehören, obwohl man es auf Grund der von Geitler stammenden Beschreibung und seiner Zeichnungen mit keiner von den bekannten Arten identifizieren kann. Es gelang Geitler nicht eine Kultur von *P. parasiticum* zu erhalten, er versuchte aber nicht es auf Zellulose zu züchten. Eine Überimpfung auf gesunde *Cladophora*-Fäden ist ihm auch nicht gelungen.

Es wurde aber mehrmals (6) beobachtet, daß manche Myxobakterien, besonders die *Sorangium*-Arten aus der Erde nicht nur auf sterilisierten Kaninchenmist übergingen, sondern sich auch auf dem

Boden und den Seiten der mit Erde beschickten und mit Fließpapier ausgekleideten Gefäße ansiedelten. Die Papierfasern wurden dabei sowohl von außen mit Zysten bedeckt wie auch von innen mit ihnen angefüllt (7). Man erhielt auf diese Weise auf Filtrierpapier das *Sorangium compositum* aus dem Löß von Radkowice (Woj. Kielce), aus der Erde eines Gemüsegartens in Lwów, aus dem Hochmoor unter dem Turkuł im Czarnohoragebiet, und das *S. spumosum* aus der Erde von Radkowice, aus humusreicher Erde von Ostra Skala (Woj. Tarnopol) und aus dem Moor von Dublany bei Lwów.

Es lag also die Vermutung nahe, daß diese Organismen doch Zellulose für sich verwerten können. Das Vorkommen verschiedener Bakterien und Pilze in den Mistbodenkulturen erschwerte jedoch die Lösung dieser Frage.

Die Wahrscheinlichkeit einer Zellulosezersetzung durch *Sorangium compositum* stieg, als im J. 1931 in den von Frau Dr. Ziemiecka zwecks Erforschung der zellulosezersetzenden Bakterien nach der Methode von Winogradsky (14) angelegten Kulturen die orange-roten Kolonien dieser Myxobakterie auf dem die Kieselplatte bedeckenden Filtrierpapier erschienen. Eine Rohkultur dieser Myxobakterie wurde uns von Frau Dr. Ziemiecka überlassen und sie wird bei uns weitergeführt.

Die Versuche auf Fließpapier andere Myxobakterien zu züchten und zwar die Arten, die auf Dünger- und Kartoffelextrakt gut gedeihen (z. B. *Myxococcus rubescens*, *M. virescens*, *Archangium gephyra*, *Chondrococcus coralloides*, *Angiococcus disciformis* und *Polyangium fuscum*), sowie das manchmal in Erdkulturen erscheinende *Sorangium sorediatum* führten, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Jahn, zu keinem Erfolge. Andererseits gelang es außer *S. compositum* auf Filtrierpapier unmittelbar aus Erde noch drei andere Arten dieser Gattung zu erhalten, die ähnlich wie *S. compositum* auf neues, mit einer Minerallösung befeuchtetes Papier übergeimpft, sich immer gut entwickelten und die Zellulose sichtlich zersetzten.

Gewöhnlich ging man auf diese Weise vor, daß man feuchte Erde mit Filtrierpapier bedeckte, oder Papier auf Kieselsäureplatten legte und darauf, wie es Winogradsky tat (14), kleine Erdpartikelchen verteilte. Diente die Erde als Substrat, so befeuchtete man sie mit Leitungswasser bei Zugabe von 100—150 mg KNO_3 auf je 20—40 g Erde. Den Kieselsäureplatten setzte man eine

volle Minerallösung zu. Die Züchtung der Kulturen erfolgte im Thermostat bei 28—30° C; man achtete darauf sie vor dem Austrocknen zu schützen. Nach Verlauf von 2—4 Wochen wurden manchmal auf dem Filtrierpapier neben vielen Kolonien von Bakterien und Pilzen auch Kolonien von Myxobakterien vorgefunden. Das seltene Erscheinen der Myxobakterien würde darauf hinweisen, daß sie entweder überhaupt wenig verbreitet sind und im Prozeß der Zellulosezersetzung im Boden keine größere Rolle spielen, oder daß eine geeignete Methode ihrer Heranzüchtung uns noch immer fehlt.

Auf diesem Wege erhielt man manchmal auf dem Filtrierpapier auch den *Myxococcus rubescens*, das *Polyangium fuscum* und das *Sorangium sorediatum*, die jedoch den früheren Beobachtungen gemäß sich nicht entwickelten, wenn man sie auf einen frischen Zellulosenährboden überimpfte. Wahrscheinlich konnten sie nur die Zwischenprodukte der durch andere Mikroorganismen verursachten Zellulosezersetzung gebrauchen. Auf dem neuen Zellulosenährboden entwickelten sich nur die Myxobakterien der Gattung *Sorangium* (mit der einzigen Ausnahme des *Sorangium sorediatum*) und manche *Archangium*-Arten.

Unter den auf die oben beschriebene Weise aus Erde gezüchteten Organismen befinden sich neben *Sorangium compositum* und *S. spumosum*, die uns aus Düngerkulturen bereits bekannt sind, auch einige neue Arten von Myxobakterien. Es muß somit im Nachfolgenden dem Berichte über ihre Lebensbedingungen eine Beschreibung ihrer Arteigenschaften vorangestellt werden.

II.

Jahn (2) sonderte aus *Polyangium*, einer von Thaxter (12) festgesetzten Myxobakterien-Gattung, einige Arten als eine neue Familie der *Sorangiaceae* mit der einzigen Gattung *Sorangium* ab. Zu dieser Gattung gehören Thaxters: *Polyangium compositum*, *P. sorediatum* und *P. septatum*. Jahn beschrieb außerdem als neue Art das *Sorangium Schröteri*; H. und S. Krzemieniewscy (6) isolierten später zwei neue Formen: *S. sorediatum macrocystum* und *S. septatum microcystum*, sowie eine neue Art: *S. spumosum*; Jahns *Sorangium Schröteri* schlossen sie zugleich dem *S. compositum* an.

Jetzt gelang es auf Filtrierpapier, neben den bereits bekannten Arten *S. compositum* und *S. spumosum*, zwei neue Arten und zwar: *Sorangium nigrescens* und *S. nigrum* zu züchten. Die Gattung *Sorangium* enthält somit im Ganzen 8 Arten.

Das wichtigste Kennzeichen der Sorangien ist, daß ihre Fruchtkörper aus zahlreichen kleinen, runden, oder ovalen, von einer gemeinschaftlichen Schleimhülle umgebenen Zysten bestehen, deren Wände infolge des gegenseitigen Druckes oft eine polygonale Form annehmen. Jede Zyste ist mit einer durchsichtigen Haut bedeckt, die einen deutlichen äußeren und inneren Umriß aufweist. Charakteristisch für alle *Sorangiaceae* (8) ist auch die Gestalt ihrer vegetativen Zellen: diese sind gerade, gleichmäßig dick und weisen breite, stumpf abgerundete Enden auf. Bei manchen Arten, wie z. B. bei *S. compositum*, sind die kleinen Zysten (in diesem Falle sekundäre Zysten genannt) zu mehreren Anhäufungen, den sogenannten primären Zysten (Thaxter's »primary cysts«) angesammelt, die erst in ihrer Gesamtheit den Fruchtkörper bilden.

Die nachfolgende genaue Betrachtung der *Sorangium*-Arten beschränkt sich nur auf diejenigen, die man in Zellulosekulturen erhalten hat. Es sind das: *Sorangium compositum* (Th.) Jahn, *S. spumosum* H. und S. Krzem., *S. nigrescens* n. sp. und *S. nigrum* n. sp.

Sorangium compositum (Th.) Jahn fand Thaxter (12) nur ein einziges Mal in einer alten Kaninchenmistkultur in Form einer von einer Schleimhülle umgebenen Anhäufung (Sorus) großer d. h. primärer Zysten, die aus vielen kleineren, sekundären Zysten zusammengesetzt waren. Die Größe der Primärzysten betrug $75 \times 125 - 35 \times 35 \mu$, durchschnittlich $75 \times 100 \mu$. Die in ihnen eingeschlossenen Sekundärzysten waren von $10 - 15 \mu$ Durchmesser. Die Entwicklung von *S. compositum* hat Thaxter nicht verfolgen können, er konnte deshalb auch die Größe der vegetativen Stäbchenzellen nicht angeben. Fruchtkörper orangegelb, beim Eintrocknen ins Rot übergehend. Die Sori enthalten selten mehr als 6 Primärzysten, und bestehen oft nur aus einer einzigen. Die Form der Primärzysten ist mannigfach; sie sind entweder unregelmäßig geformt, oder elliptisch, rundlich, eingeschnitten, schließlich auch eingeschnürt. Die in ihnen eingeschlossenen Sekundärzysten sind manchmal derart gruppiert, daß es den Anschein hat, als ob zwischen den primären und sekundären Zysten noch eine Mittelform der

Zysten existieren würde. Die Sori der Primärzysten sind von außen von einer gelblichen oder farblosen Schleimhülle umgeben; eine gelbe, oder orangefarbige Hülle ist auch um jede einzelne Primärzyste sichtbar. Die Sekundärzysten haben eine dünne durchsichtige farblose Membran.

Beim Züchten von Myxobakterien aus Erde begegnete man oft dem *S. compositum* und zwar in verschiedenartigen Böden, unabhängig von ihrer aktuellen Azidität (pH) (8). Die Fruchtkörper von *S. compositum* wiesen des öfteren manche Unterschiede auf, man vermochte jedoch, wegen des Auftretens von Mittelformen, die verschiedenen Formen nicht voneinander zu trennen. Es wurde also angenommen (6), daß die Art *S. compositum* alle Myxobakterien umfaßt, deren von einer orange-gelben oder orange-roten Schleimhülle umschlossene Fruchtkörper sich aus kleinen Zysten mit farblosen Membranen zusammensetzen; manchmal sind die letzteren in den Fruchtkörpern zu mehreren kleinen Gruppen verteilt. Die Unterteilung dieser Gesamtart könnte nur auf Grund von Kulturen erfolgen, denn nur die Kulturen der verschiedenen Formen von *S. compositum* könnten ihre Beständigkeit und gegenseitiges Verhältnis bestimmen. Bis jetzt hat aber *S. compositum* allen Proben einer Übertragung auf künstlichen Nährboden, oder auf sterilisierten Mist Widerstand geleistet. Erst die Anwendung der Zellulose als Kohlenstoffquelle hat zum ersten Male die Kultur dieser Myxobakterien ermöglicht.

In Kulturen auf Zellulose erhielt man Formen von *S. compositum*, die sich durch die Größe der Primärzysten und ihrer Anhäufungen, durch die Menge des ausgeschiedenen Schleimes und seine stärkere oder schwächeré Färbung, endlich durch die Art der Verbreitung des Schwarmes auf Filrierpapier und sogar durch das Vermögen der Zellulosezersetzung voneinander deutlich unterscheiden.

1. Die dem Thaxter'schen Typus entsprechenden Formen von *Sorangium compositum* bildeten auf Fließpapier entweder große unregelmäßig geformte Anhäufungen von kleinen Zysten, oder ausgesprochene Primärzysten von runden oder ovalen Umrissen; letztere erreichen bis 100μ im Durchmesser. Eine jede von ihnen ist von einer orangegelben, von innen scharf umrissenen, nach außen sich allmählich verlierenden und immer schwächer gefärbten Schleimhülle umgeben (Photo 1, Pl. 2). Außerdem pfliegten sich im Inneren oder auf der Oberfläche der Zellulosefasern Reihen von

Sekundärzysten zu bilden, die nur von einer dünnen, gelben, gemeinsamen Hülle umgeben waren. Die von farblosen Membranen umgrenzten Sekundärzysten erreichten eine Größe von $7-18 \times 8-20 \mu$, durchschnittlich $10-15 \mu$ (Photo 2).

Diese Form (I) des *S. compositum* wurde mehrere Male auf Mist in Erdkulturen gefunden und in einer von diesen Kulturen, zu der als Substrat das Löß aus Radkowice (Woj. Kielce) verwendet wurde, bildete sie auf dem den Boden des Glasgefäßes auskleidenden Fließpapier eine große Kolonie. Im Jahre 1932 hat man sie wieder aus derselben Erde erhalten und auf Filtrierpapier übertragen. Dieselbe Form erhielt auf Filtrierpapier Frau Dr. Ziemięcka im J. 1931 aus einem Ackerboden (Górna Nizna, Woj. Lublin). Ihre Kultur wird von uns ständig fortgeführt, in dem man sie von Zellulose auf Zellulose überimpft. Sie entwickelte sich längere Zeit hindurch gut, begann erst gegen Ende des fünften Kulturjahres sich etwas schwächer zu entwickeln und die Fähigkeit der Zystenbildung zu verlieren. Dies wurde vielleicht durch die ständige Überimpfung von vegetativen Zellen verursacht, wozu man wegen der oft trägen und sehr unregelmäßigen Zystenkeimung greifen mußte. Junge Kulturen erhält man aus Zysten oft schon nach 4 Tagen, manchmal muß man aber mehr als zehn Tage lang auf ihre Keimung warten.

In älteren Kulturen dieser Form des *S. compositum* auf Zellulose bemerkt man oft Primärzysten mit Sekundärzysten, die keine eigenen Membranen aufzuweisen haben und in einer bedeutenden Entfernung voneinander liegen (Photo 4). Den Zwischenraum füllt ein dicker, orangegeletter Schleim, in dem man deutlich eine konzentrische Schichtung bemerkt. Die Sekundärzysten sind dann viel kleiner als die normalen. Außerdem begegnet man manchmal noch im Innern der Sekundärzysten kleineren, frei liegenden Zysten, die eine eigene Membran besitzen. Dieser Wandlungen im Bereiche der Sekundärzysten wurde schon früher Erwähnung getan (5). Ähnliche innere Zysten hat auch V a h l e (13) beobachtet. Eine nähere Untersuchung ergibt, daß sich in diesem Falle der Inhalt der Sekundärzysten nach einiger Zeit verändert: die in ihnen enthaltene Stäbchenmasse verteilt sich zuerst in kleine Gruppen, die äußeren Gruppen wandeln sich allmählich in eine gelbgefärbte Schleimhülle um, mit deutlicher Schichtenstruktur. Das verursacht eine allmähliche Verringerung des Inhaltes der Zysten;

die Abstände zwischen ihnen werden dabei größer und füllen sich mit den Schichten ihrer Hüllen. In den Hüllen sieht man lange hie und da Überreste der Stäbchen, die sie gebildet haben. Manchmal bilden sich aber um den reduzierten Inhalt der Sekundärzysten neue durchsichtige, farblose Membranen und man bemerkt dann im Innern der früheren Zysten gewöhnlich eine einzelne, manchmal aber auch zwei kleinere frei liegende Zysten. Diese Änderungen der Sekundärzysten der erwähnten Form von *S. compositum* sind sehr charakteristisch. Wir begegnen ihnen nicht bei anderen Formen.

Junge vegetative Stäbchen dieses *S. compositum* weisen in der Masse helle fleischrote Färbung auf (Photo 5).

Eine andere Form (II) des *S. compositum* erhielt man auf Filtrierpapier, das man auf Erde aus dem Botanischen Garten in Lwów ausbreitete, und aus Löß von Radkowice, indem man nach der Methode von Winogradsky kleine Erdklumpen auf Filtrierpapier verstreute. Diese Form weicht vom Typus ab durch ihre viel kleineren Primärzysten, die höchstens 50μ im Durchmesser erreichen, wobei Zysten von geringeren Ausmaßen stark zu überwiegen pflegen. Zum Unterschied vom Typus bilden sich die Zysten meistens auf der Oberfläche der Papierfaser oder in ihrem Innern. Deshalb gruppieren sich die Zysten in lange Reihen (Photo 6). Die Primärzysten sind von einer dünnen, gelben Schleimhülle bedeckt, deren Farbstoff nur wenig in den herumliegenden Schleim diffundiert. Oft begegnet man in Kulturen auf Filtrierpapier dickwandigen Fasern, um die sich aus vegetativen Stäbchen und aus Schleim geformte Stränge ringelförmig winden.

Die Sekundärzysten dieser Spielart unterscheiden sich nicht von denjenigen der typischen Form, ihre Größe beträgt $6-16 \times 7-18\mu$ im Durchmesser, meistens $8-12\mu$. Die Entwicklung dieser Form auf Filtrierpapier oder Baumwollstoff geht langsamer vor sich, das Bild als ganzes erinnert aber an die typische Form des *S. compositum*. Die Mitte der Kolonien wird von der orangegelben Anhäufung der eng bei einander liegenden Zysten eingenommen, am Rande der Kolonie befindet sich ein Saum aus graugelben Zellulosefasern, die von vegetativen Zellen überzogen sind. In der Masse unterscheiden sich also die vegetativen Stäbchen dieser Form von der typischen durch ihre Färbung. Ihre Größe ist aber bei beiden dieselbe (Photo 8).

Anders sehen die Kulturen der dritten Form (III) des *S. compositum* aus, die neben der zweiten aus dem Boden des Botanischen Gartens in Lwów erhalten wurde. Der hellgelbe Schwarm der vegetativen Stäbchen bedeckt sehr schnell die ganze Oberfläche des Filtrierpapiers von 7 cm Durchmesser. Auf Baumwollstoff ist die Schicht der Zellen wegen der Abstände zwischen den verflochtenen Fäden des Stoffes viel loser. Die Größe der Primärzysten und die Art ihrer Gruppierung auf der Oberfläche der Fasern und in ihrem Innern ist dieselbe wie bei der zweiten Form (Photo 9); die Art der Zystenbildung auf dem Nährboden ist jedoch eine andere. Die Zystenbildung beginnt an verschiedenen Stellen der Kultur und nicht in ihrer Mitte, und das erst dann, wenn fast die ganze Oberfläche des Nährbodens mit vegetativen Zellen bedeckt ist. Die Primärzysten liegen lose, zwischen ihnen bleiben Fasern, die nicht ganz zerlegt worden sind, was bei den beiden früher beschriebenen Formen nie der Fall war. Die Größe der Sekundärzysten ist $6-13 \times 7-14 \mu$, sie sind also etwas kleiner als bei den Formen I und II.

In den Kulturen dieser Form begegnet man ähnlich wie in den vorherigen, jedoch viel öfters, dickwandigen Fasern, die quer von Schleimstreifen umringt sind, die vegetativen Stäbchenzellen enthalten (Photo 10).

Die Unterschiede in der Entwicklung dieser drei Formen des *S. compositum* erwiesen sich in der Kultur als konstant. Die Unterteilung der Art *S. compositum* in kleinere systematische Einheiten wäre jetzt eher begründet als damals, da man sie nur im Stadium fertiger Fruchtkörper auf Mist beobachten konnte, um so mehr als die verschiedenen Formen des *S. compositum* nicht die gleiche Fähigkeit der Zellulosezersetzung besitzen. Es gibt wahrscheinlich auch solche Formen des *S. compositum*, die die Fähigkeit der Zellulosezersetzung gar nicht besitzen. Es spricht dafür der Umstand, daß die Überimpfung auf Zellulose der in Erdekultur auf Kaninchenmist erhaltenen Fruchtkörper meistens nicht gelingt.

Da man nun das *S. compositum* in der Kultur besaß, konnte man zum ersten Male die Größe seiner vegetativen Zellen feststellen. Thaxter (12) hat sie, wie erwähnt, nicht angeben können, ebenso hat Jahn (2) nur die in Zysten eingeschlossenen Zellen einer Messung unterwerfen können und ihre Größe gleich 5μ bestimmt. Unsere vorherigen Messungen der Zystenstäbchen (5) ergaben

2—3.5×0.5 μ und 2—4×0.5—0.6 μ . Die Größe der etwas jüngeren Stäbchen aus einem Schwarme, der sich schon zur Fruchtkörperbildung anschickte, betrug 2.6—6×0.6—0.9 μ . Alle diese Stäbchen waren zweifelsohne etwas kleiner als die eigentlichen vegetativen Zellen. Jetzt, nachdem man das *S. compositum* auf Zellulose in Kultur gewann, konnte wirklich festgestellt werden, daß seine vegetativen Stäbchen größer und vor allem viel dicker sind, da sie die Ausmaße von 3—6×1.3—1.4 μ aufweisen. Dagegen können zwischen den vegetativen Stäbchen verschiedener Formen von *S. compositum* keine greifbaren Unterschiede festgestellt werden. Im Laufe der Zystenbildung werden die Stäbchen kleiner. Bei der typischen Form reduziert sich ihre Größe in den jungen Zysten bis auf 1.3×0.8 μ .

Die Bestimmung der Größe der in den Zysten eingeschlossenen Stäbchen stößt auf große Schwierigkeiten. Die Zysten lassen sich nämlich erst bei sehr starkem Drucke zerlegen, der vor allem in den Zysten das Erscheinen von Fetttropfen bewirkt, wobei die Zellen etwas beschädigt werden. Reißt nun die Zystenmembran, so quillt aus dem Innern der Zyste nur eine feinkörnige Substanz heraus, in der nur wenige unverzehrte Stäbchen vorkommen.

2. *Sorangium spumosum* H. und S. Krzem. Die Fruchtkörper bestehen aus zahlreichen Zysten, die zu kugeligen oder ovalen unmittelbar im Schleime versenkten Körpern verbunden sind (Photo 12, Pl. 3). Diese Fruchtkörper kann man durch Analogie mit *S. compositum* als Primärzysten betrachten, doch unterscheiden sie sich von ihnen dadurch, daß sie von keiner deutlichen gemeinsamen Hülle umgeben sind, sondern nur von einer Schicht farblosen Schleimes, die sich leicht auflöst und Sekundärzysten mit farbloser, durchsichtiger Membran frei werden läßt. Die Größe der Primärzysten, die bis 400 μ im Durchmesser erreichen, konnte nur auf Grund des auf Mist gesammelten Materials bestimmt werden; in Zellulosekulturen ist die sie bedeckende Schleimschicht so schwach, daß sie unter dem Druck des Deckglases in Sekundärzysten zerfallen, so daß ihre Größe nicht bestimmt werden kann. In den Kulturen auf Filtrierpapier oder Baumwollstoff kommen neben den zusammengesetzten Fruchtkörpern, und das oft in überwiegender Zahl, auch Sekundärzysten vor, die auf der Oberfläche der Fasern oder in ihrem Innern in einfache Längsreihen angeordnet sind (6).

In der Masse betrachtet sind die vegetativen Stäbchen, sowohl wie auch die in den Zysten eingeschlossenen Zellen von fleischroter Farbe, welchem Umstand die Kulturen ihre intensive rosa-Färbung verdanken.

Der Größe der Sekundärzysten nach unterscheidet man zwei Formen des *S. spumosum*. Die eine hat Zysten von $7-18 \times 9-23 \mu$ Durchmesser (meistens $9-15 \mu$) (Photo 13), die Zysten der zweiten Form sind größer und erreichen im Durchmesser $13-24 \times 16-34 \mu$ (meistens $16-24 \mu$) (Photo 15, 16). Die Größenunterschiede der Zysten beider Formen bleiben in der Kultur auch nach vielen Überimpfungen erhalten, sie sind demnach als konstant aufzufassen. Die vegetativen Stäbchen (Photo 14) sind von der gleichen Art wie bei *S. compositum*. Sie sind demnach gleichmäßig dick, gerade und weisen stumpf abgerundete Enden auf. Die Stäbchenausmaße der Form mit kleineren Zysten betragen $2.7-5.5 \times 1.1-1.5 \mu$, meistens $3.8 \times 1.3 \mu$; diejenigen der Form mit größeren Zysten $2.7-6.0 \times 1.1-1.5 \mu$, meistens $4.5-5.6 \times 1.4 \mu$; in jungen Kulturen erreichen manchmal die Zellen eine Länge von sogar 10μ .

Wie schon erwähnt, wurde das *S. spumosum* mit kleineren Zysten zuerst in Mistkulturen gefunden, dann hat man es öfters auf Filtrierpapier erhalten, das auf feuchter Erde ausgebreitet wurde, wie auch in den nach Winogradsky's Methode angelegten Kulturen. Es ist überhaupt die am öftesten vorkommende von allen *Sorangium*-Arten. Man hat es einigemal aus der Erde des Botanischen Gartens erhalten, auch aus Blätterkompost und aus Löß von Radkowice (Woj. Kielce). Die Form mit den größeren Zysten wurde nur ein einziges Mal neben der ersten Form im April 1936 aus der Erde des Botanischen Gartens gewonnen.

3. *Sorangium nigrescens* n. sp. wurde in mehr als zehn Mistkulturen aus Sandboden vom Kiefernwalde in Ciemianka (Woj. Białystok) zugleich mit *S. spumosum* gewonnen. Zuerst wurde es auch als *S. spumosum* bezeichnet und erst die aus Trockenmaterial angelegten Zellulosekulturen zeigten, daß es sich um eine von *S. spumosum* vollkommen verschiedene neue Art handelt. Die Sekundärzysten bilden Ansammlungen oder sog. Primärzysten von wechselnder Größe (Durchmesser bis 200μ). Auf Dünger sind Primärzysten dicht mit stark zusammenhängenden Sekundärzysten ausgefüllt und zerfallen schwerer als bei *S. spumosum*. Die Primärzysten sind unregelmäßig geformt und von einer farblosen Schleim-

hülle umgeben (Photo 17). In Kulturen mit Filtrierpapier sind neben gut geformten Primärzysten oft auch lose liegende, unmittelbar im Schleim versenkte Sekundärzysten sichtbar. Die Messungen der Sekundärzysten ergeben $5-12 \times 6-15 \mu$, meistens $6 \times 10 \mu$ im Durchmesser (Photo 18). Die Sekundärzysten sind von einer durchsichtigen, zuerst farblosen, später etwas bräunlich werdenden Membran umgeben. In der Masse betrachtet sind die jungen Zysten schmutzig-gelblich, die älteren — graubraun und schwärzlich; beim Eintrocknen werden sie vollkommen schwarz. Ihre Farbe stammt nicht nur von den bräunlich werdenden Membranen, sondern auch von der grauen Masse der in ihnen eingeschlossenen Stäbchen. Auf Filtrierpapier wird die Mitte der Kolonie von den dunklen Fruchtkörpern eingenommen, an ihrem Rande befindet sich ein graugelblicher Saum, der aus Zellulosefasern besteht; die letzteren sind von außen mit vegetativen Stäbchen bedeckt, und ebenso von innen mit ihnen angefüllt. Die Ausmaße der vegetativen Zellen betragen $2.5-6.4 \times 1.2-1.4 \mu$ (Photo 21). In jungen Kulturen sind die den Fasern unmittelbar aufliegenden Stäbchen kürzer und nur $1.7-3.8 \mu$ lang.

Seit 1931 wurde dieses *Sorangium* ständig auf Zellulose als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. Erst im Herbst 1936, d. h. nach fünfjähriger Kultur hat es begonnen sich schwächer zu entwickeln, wobei sich die Fruchtkörper langsamer und spärlicher bilden.

In den nach Winogradsky's Methode angelegten Kulturen wurde *S. nigrescens* nur zweimal aus Löß von Radkowiec (woj. Kielce) gewonnen.

4. *Sorangium nigrum* n. sp. Im April 1936 erschien auf Filtrierpapier, das auf feuchter Gartenerde ausgebreitet war, ein *Sorangium*, dessen Farbe an *S. nigrescens* erinnerte. Während jedoch die frischen Kolonien von *S. nigrescens* eine braunschwarze Färbung besitzen und erst beim Eintrocknen schwarz werden, ist *S. nigrum* sogar in frischfeuchtem Zustande tiefschwarz. Auf Filtrierpapier sind die schwarzen Kolonien von einem hell orange-farbigem Saume umrandet, der aus mit vegetativen Stäbchen bedeckten Papierfasern besteht. Auf Baumwollstoff ist der Saum von einer hellen schmutzig-gelben Farbe, mit einem leichten Stich ins Rote, die Mitte der Kolonie macht dagegen, bei schwacher Vergrößerung betrachtet, den Eindruck, als ob sie aus schwarzen

Pilzhyphen gewoben wäre; es ist dies eine Folge davon, daß die Zysten eng mit den Fasern zusammenhängen und sich an sie anzulegen pflegen (Photo 22, 23, Pl. 4). Im Unterschied von *S. nigrescens* bildet *S. nigrum* keine ausgesprochenen Primärzysten; nur selten begegnet man spärlichen, aus wenigen Zysten bestehenden Ansammlungen (Photo 24), die von einer rauchfarbenen Schleimhülle zusammengehalten werden. Meistens liegen die Zysten in Reihen angeordnet im Innern der Zellulosefasern, wobei die veränderte Fasernsubstanz eine gemeinsame Scheide um sie bildet (Photo 31). Eine jede Zyste ist jedoch für sich von einer eigenen Schleimhülle umrandet, die sich von den aus den veränderten Faserwänden gebildeten Schläuchen deutlich abhebt. Die Zysten sind merklich größer als diejenigen von *S. nigrescens*; ihre Ausmaße betragen nämlich $9-16 \times 9-23 \mu$, meistens $10-18 \mu$. Ihre Membranen sind ziemlich dick, durchsichtig, farblos und werden mit der Zeit ein wenig hellbraun. Unter dem Einfluß von *S. nigrum* schwellen die Fasern an und färben sich graubraun, oder sogar braun mit einem Stich ins Violette. Sie verlieren dabei die Eigenschaften der Zellulose und ergeben mit $ZnCl_2$ und JJK keine charakteristische Reaktion.

Die Messungen der vegetativen Stäbchen ergeben $2.5-5.5 \times 1.1-1.3 \mu$, manchmal kommen aber, ähnlich wie bei *S. spumosum*, sogar 10μ lange Stäbchenzellen vor (Photo 26).

Außer den Vertretern der Gattung *Sorangium* wurden noch stark zellulosezersetzende Myxobakterien gefunden, die der Gattung *Archangium* zuzuzählen sind. Die Gattung *Archangium* hat Jahn (2) für jene Myxobakterien geschaffen, deren Zellen im Laufe der Fruchtkörperbildung sich nicht zu runden Sporen umgestalten und deren Fruchtkörper keine eigenen Hüllen besitzen, demnach keine Zysten darstellen. Der Gattung *Archangium* hat Jahn Thaxters (11) *Chondromyces serpens*, und ebenso Koflers (4) *Polyangium flavum* zugezählt, außerdem fügte er noch die von ihm beschriebenen: *Archangium gephyra*, *A. Thaxteri* und *A. primigenium* hinzu, wobei die letztgenannte Art auch das *Polyangium primigenium* von Q u e l (10) umfassen soll. Alle diese Myxobakterien bilden unregelmäßig geformte, an ihrer Oberfläche ungleich abgerundete, oft Einschnürungen aufweisende Fruchtkörper, die manchmal aus wulstigen, wirr durcheinander gewundenen Schläuchen zu bestehen scheinen. In Hinsicht auf die Gestalt der vegetativen

Zellen haben wir (9) seinerzeit im Bereiche der Gattung *Archangium* zwei Typen unterschieden. Die vegetativen Zellen der einen Arten, wie z. B. von *Polyangium primigenium* Quehl und *Polyangium flavum* Kofler sind gleichmäßig dick, und zeichnen sich durch ihre nicht zugespitzte, sondern stumpf abgerundete Enden aus; die Zellen der anderen Arten, zu denen *Archangium gephyra* Jahn und *Archangium assurgens* H. und S. Krzem. (*A. primigenium* var. *assurgens* Jahn) zu zählen sind, sind spindelförmig von Gestalt und an den Enden zugespitzt. Über die Gestalt der vegetativen Zellen des *Archangium Thaxteri* konnte Jahn nichts aussagen, da seine Versuche diese Art auf Mistagar oder auf Mistwasser zu züchten mißlungen sind und er die vegetativen Zellen nicht beobachten konnte. Die vegetativen Zellen der zwei jetzt gewonnenen Arten von *Archangium* erinnern, was ihre Gestalt anbetrifft, an das *Polyangium flavum* Kofler und *P. primigenium* Quehl; sie sind demnach gerade, in ihrer ganzen Länge gleichmäßig dick und stumpf abgerundet an ihren Enden. In dieser Hinsicht gleichen sie also ganz den *Sorangium*-Zellen, und die Ähnlichkeit ist um so größer als die vegetativen Zellen der beiden Archangien und diejenigen von *Sorangium* von derselben Größe sind (Photo 28, 30), viel dicker somit als die Zellen von *Polyangium flavum* und *P. primigenium*, dagegen wenig verschieden von den Zellen von *Archangium Thaxteri*, die von uns gleichfalls beobachtet werden konnten. Von den Sorangien lassen sich die beiden in Rede stehenden Archangien nur im Fruktifikationszustande unterscheiden.

5. Von den beiden neu gewonnenen Arten von *Archangium* bildet die eine auf Baumwolle oder auf Filtrierpapier hellgelbe Kolonien, deren Ränder der größeren Zellanhäufung wegen, stärker gefärbt sind. In der Mitte der Kolonie entstehen, nachdem die Zellulose an dieser Stelle bereits vollständig zerstört wurde, auf fast farbloser, etwas erhöhter Schleimunterlage die hellgelben Fruchtkörper. Die Fruchtkörper haben die Gestalt von bis 1 mm langen und bis 0.5 mm breiten Klümpchen oder Röllchen (Photo 27); neben diesen verhältnismäßig großen Fruchtkörpern kommen auch kleinere, gleichfalls unförmige oder rundliche vor, von 80—200 μ Durchmesser. Die Fruchtkörper sind mit einem feinen, durchsichtigen Schleim bedeckt, durch welchen hindurch die in ihnen eingeschlossene Stäbchenmasse sichtbar ist; diese erscheint gewunden

oder in Form von mehreren unförmigen Gebilden, die an unvollkommen ausgebildete Zysten erinnern. Diese Scheinzysten bilden jedoch nie eigene Membranen. Die vegetativen Stäbchen sind, wie erwähnt, gerade und an den Enden stumpf abgerundet. Die Mehrzahl der Stäbchen hat eine Größe von $2.9-4.2 \times 1.3-1.5 \mu$, es kommen aber auch etwas kürzere (bis 2μ) und längere (bis 5μ), sowie auch etwas dickere (bis 1.7μ) vor. Im Bereiche der Fruchtkörper sind die Stäbchen dünner, sie bilden aber eine so kompakte Masse, daß man ihre Ausmaße nicht genau angeben kann. In sehr jungen Fruchtkörpern überwiegen Stäbchen in den Ausmassen von $2.1-2.9 \times 1.1-1.5 \mu$.

Diese Art wurde neben *Sorangium compositum* F. II und F. III aus der Erde des Botanischen Gartens gewonnen.

6. Ein anderes *Archangium* erhielt man zusammen in einer Kultur mit *S. nigrum* auf Filtrierpapier, das auf Gartenerde ausgebreitet war. Beim Überimpfen des *Sorangium nigrum* auf neuen Nährboden, wurden in der ersten Zeit, wie gewöhnlich, die vegetativen Stäbchenzellen vom Rande der Kolonie übertragen. Bei dieser Art von Impfen erhielt man mit der Zeit Kulturen mit immer breiterem orangerötlichem Saume, und immer spärlicher sich bildenden schwarzen Zysten. Endlich entwickelte sich nach einer Überimpfung eine orangerote Kolonie, in der die Bildung der Zysten vollkommen unterblieb. Weitere Überimpfungen ergaben ständig Kulturen ohne schwarze Zysten, wobei aber neben orange-rötlichen vegetativen Stäbchen sich unregelmäßig geformte Fruchtkörper von gleicher Farbe zu bilden begannen, deren ganzes Aussehen darauf deutete, daß man es mit einem *Archangium* zu tun hatte. Da sich dieses *Archangium* zusammen mit *S. nigrum* entwickelte, mußten nach Feststellung dieser Tatsache die Kulturen des *S. nigrum* gereinigt werden, was auf diese Weise erzielt wurde, daß man auf neuen Nährboden nicht die vegetativen Zellen der Mischkulturen sondern die Zysten selbst übertrug.

Die früheren Kulturen waren somit eigentlich ein Gemisch von Zellen beider Arten, die man im vegetativen Zustande, ihrer ähnlichen Gestalt wegen, unter dem Mikroskop nicht unterscheiden konnte.

Das aus roher *S. nigrum*-Kultur isolierte *Archangium* bildet auf Zellulose orange-rötliche Kolonien mit stärker gefärbtem Rande. In der Mitte der Kolonie bilden sich lose zerstreute Fruchtkörper

von unregelmäßiger Gestalt. Sie sind viel kleiner (Photo 29) als diejenigen des gelben *Archangium* und erreichen eine Größe von 200—600 μ . Sie bestehen aus einer Masse von Stäbchen, die wulstige Klümpchen und Windungen bildet. Die Ausmaße der vegetativen Stäbchen betragen $3.8-5.5 \times 1.3-1.5 \mu$. Die Stäbchen sind also etwas länger als diejenigen des ersten *Archangium*. Manchmal begegnet man längeren Stäbchen (bis 8μ) und dickeren (bis 1.7μ). In jüngeren Fruchtkörpern sind die Stäbchen etwas kürzer ($2.5-3.8 \mu$), dabei auch dünner ($0.8-1.1 \mu$). In älteren Fruchtkörpern sind sie dem Bilde nach, das sie in der Masse ergeben, zu urteilen, noch dünner; genau konnte aber ihre Größe nicht bestimmt werden, weil sich die Fruchtkörper nicht zerreiben lassen, ohne daß die Zellen beschädigt werden.

Den beiden oben beschriebenen Formen von *Archangium* werden in dieser Arbeit keine neuen Artbezeichnungen beigegeben, da es nicht unmöglich ist, daß es sich in diesem Falle um Sorangien in einem veränderten Zustande handelt. Es könnte darauf der Umstand deuten, daß bei dem ersten, gelben *Archangium* eine deutliche Tendenz zur Zystenbildung bemerkbar ist, welche jedoch nicht erfolgt. Es wurde auch die Erfahrung gemacht, daß ein in Kultur befindliches *Sorangium* im Laufe der Zeit die Befähigung zur Zystenbildung verlieren kann, wie dies bei einem Stamm von *S. compositum* der Fall war. Es scheint demnach möglich zu sein, daß in ein und derselben Kolonie beide Formen einer Art, die normale und die geänderte existieren könnten. Würde das der Fall sein, so wäre auch die Möglichkeit vorhanden beide Formen voneinander zu trennen und zwar auf dieselbe Weise, in welcher die Isolierung des gelben *Archangium* aus der zweiten Form von *S. compositum* erfolgte.

Wir haben bereits früher (9) auf die besondere Form der vegetativen Zellen aller Arten der Gattung *Sorangium* und mancher *Archangium*-Arten aufmerksam gemacht, und dabei festgestellt, daß die vegetativen Stäbchen der beiden oben beschriebenen Archangien denjenigen von *Sorangium*, ihrer Gestalt nach, vollkommen gleichen. Dieses gemeinsame Merkmal ist von großer Wichtigkeit, und zwar viel wichtiger, als das Fehlen oder Vorhandensein besonderer Zystenmembranen. Es deutet auf eine nähere Verwandtschaft mancher *Archangium*-Arten mit der Gattung *Sorangium* hin. Von der Form der vegetativen Zellen ausgehend sollte man

die Arten mit geraden, stumpf abgerundeten Enden aus der Familie der *Archangiaceae* ausscheiden und sie an die Spitze der *Sorangiaceae* stellen; in analoger Weise sollte man andere Arten wie z. B. *Archangium assurgens* H. und S. Krzem. (*Archangium primigenium* Quehl var. *assurgens* Jahn), deren vegetative Zellen spindelförmig sind und zugespitzte Enden besitzen, als primäre Formen den *Polyangiaceae* einreihen. Auf diese Weise würden an der Spitze der *Sorangiaceae* wie der *Polyangiaceae* die ihnen entsprechenden Archangien stehen, die keine von einer Membran umrandeten Zysten bilden, sondern bloß eine Tendenz dazu aufweisen.

III.

Wenn die oben beschriebenen Arten der Myxobakterien auf Baumwollstoff oder Filtrierpapier, und zwar im Innern der Fasern oder auf ihrer Oberfläche zur Entwicklung gelangen, bewirken sie die Zersetzung der Zellulose. Die Baumwollhärchen zerfallen dabei in kleine fadenförmige Fragmente, die Flachsfasern werden dagegen hauptsächlich von außen angegriffen. Interessant ist hierbei, daß die sogenannten Flachsfaserknoten sich als widerstandsfähiger erweisen und langsamer abgebaut werden, als die zwischen ihnen liegenden Teile der Faser, aus welchem Grunde die äußeren Verdickungsschichten auf den Faserknoten am längsten erhalten bleiben (Photo 11). Später werden auch sie abgetrennt und zersetzt, so wie der Rest der Fasern. An Stelle der Fasern bleibt mit der Zeit nur eine mehr oder weniger dicke, schleimige Substanz.

Auf Baumwollstoff erfolgt das Wachstum der Kolonien von *Sorangium*-Arten auf eine etwas andere Weise als auf Filtrierpapier, was sich durch die abweichende Art der Verflechtung der Fasern erklären läßt. Da die Entwicklung des *Sorangium* an die Zellulose gebunden ist (Photo 19), verbreiten sich die Kolonien von ihrem Impfungsorte aus schneller den Fasern entlang. Auf diese Weise entstehen auf Baumwollstoff viereckige Kolonien, wobei der Impfungsort an der Kreuzung ihrer Diagonalen zu liegen kommt (Photo 25). Auf Filtrierpapier gibt es wegen des ordnungslosen Verlaufes der Fasern keine solchen viereckigen Kolonien, letztere sind vielmehr von rundlichen Umrissen. Man begegnet ihnen auch leicht bei der dritten Form von *S. compositum*, dessen

Entwicklungsart eine einigermaßen abweichende ist, desgleichen nicht bei den *Archangium*-Arten.

Um die Fähigkeit der Zellulosezersetzung einzelner Arten vergleichen zu können, wurden in Petrischalen von 9 cm Durchmesser auf Kieselsäuregel, dem eine Nährlösung zugefügt wurde, die KNO_3 als Stickstoffquelle enthielt, von jeder Art je zwei Kulturen angelegt. Die Minerallösung war von folgender Zusammensetzung: 1% KH_2PO_4 , 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NaCl , 0.01% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{aq}$, 0.01% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Man setzte jeder Kieselplatte 1 ccm dieser Lösung zu, dabei auch KNO_3 in einer 4.6 mg N entsprechenden Menge. Der auf einer jeden Platte ausgebreitete Baumwollstoff hatte ein Gewicht von ca 250 mg. Es wurde zuerst, um die in ihm enthaltene Stärke zu entfernen ohne die Zellulose anzugreifen, mit Diastase behandelt. Die fertigen Platten wurden im Autoklave unter Überdruck von 1 Atmosphäre sterilisiert, und darauf beimpft, wobei das Impfmateriel mittels einer gebogenen Nadel auf der Oberfläche des Baumwollstoffes ausgebreitet wurde. Das Impfmateriel entstammte alten Kulturen und bestand ausschließlich aus Zysten. Nur bei der dritten Form von *Sorangium compositum* und den beiden *Archangium*-Arten waren im Impfmateriel vegetative Zellen vorhanden. Nach zwölf-tägigem Verbleib der Kulturen im Thermostat bei 30—32° C wurde der Stoff vom Gel behutsam abgehoben, mit destilliertem Wasser gewaschen, wobei man sich bemühte seine unverzehrten Teile möglichst vollständig zu sammeln. Die Überreste des Baumwollstoffes aus je zwei parallelen Kulturen wurden sodann bei 110° C getrocknet und gewogen. Die Differenz zwischen dem Gewichte der ursprünglichen Stoffstücke, und dem Gewichte der erhaltengebliebenen Überreste gab die Menge der verbrauchten Zellulose an. Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus Tabelle I ersichtlich.

Nach diesen Ergebnissen zu urteilen, zersetzen *S. compositum* F. III, *S. spumosum* F. II, *S. nigrescens* n. sp. und die beiden *Archangium*-Arten die Zellulose kräftiger als das *S. compositum* Th., *S. compositum* F. II, *S. spumosum* H. et S. Krzem. und *S. nigrum* n. sp. Die Kulturen, mit deren Hilfe die Versuche ausgeführt worden sind, waren nicht frei von fremden Mikroorganismen, obwohl sie durch vielfaches Überimpfen auf Filtrierpapier und Baumwollstoff teilweise gereinigt waren. Bei der Reinigung wurde vor allem danach gestrebt die Kulturen von zellulosezersetzenden

TABELLE I.

Die Zellulosezersetzung in 12-tägigen Kulturen.

von	In die Kultur eingeführte Zellulose in mg	Übriggeblie- bene Zelli- lose in mg	Verbrauchte Zellulose in mg
1. <i>Sorangium compositum</i> (Th.) Jahn .	477	244	233
2. <i>Sorangium compositum</i> F. II	493	240	253
3. <i>Sorangium compositum</i> F. III	480	110	370
4. <i>Sorangium spumosum</i> H. et S. Krzem.	476	245	231
5. <i>Sorangium spumosum</i> F. II	472	164	308
6. <i>Sorangium nigrescens</i> n. sp.	478	175	303
7. <i>Sorangium nigrum</i> n. sp.	477	224	253
8. <i>Archangium 1</i> (gelbe)	525	233	292
9. <i>Archangium 2</i> (rote)	532	123	409

Bakterien zu befreien. Dies gelang ziemlich leicht, es blieben jedoch andere Bakterien, die in jungen Kulturen fast unsichtbar, sich in älteren kräftig zu entwickeln pflegten. Auf Filtrierpapier übertragen wiesen diese Bakterien keine Fähigkeit einer selbständigen Zellulosezersetzung auf. Das mikroskopische Bild der Kulturen, die im Verhältnis zu den Myxobakterien-Stäbchen verschwindend kleine Zahl fremder Bakterien und endlich die Anordnung sowohl der vegetativen Zellen wie auch der Zysten auf den Zellulosefasern, bestätigen zweifelsohne die Behauptung, daß der in diesen Versuchen festgestellte Zelluloseabbau ausschließlich eine Folge der Lebenstätigkeit der Myxobakterien ist. Dafür spricht auch der Umstand, daß das *Sorangium*, auf Zellophan kultiviert, auf demselben Korrosionsfiguren hinterläßt, die ihren Umrissen nach der Gestalt der vegetativen Zellen entsprechen.

Eine vollständige Trennung der *Sorangium*- und der *Archangium*-Kulturen ist wegen der reichlichen Schleimbildung recht schwierig. Sie ist aber unentbehrlich, soweit es sich um eine Untersuchung der Entwicklungs- und Ernährungsbedingungen der zellulosezersetzenden Myxobakterien handelt.

Sehr junge Kolonien können einigermaßen gereinigt werden, wenn man sie mehrere Male von Zellulose auf Zellulose überimpft,

so daß man auf diese Weise Kulturen gewinnen kann, in denen die fremden Organismen nur in kleiner Anzahl vorhanden sind. Wird nun von solch einer Kolonie auf reinen Agar, oder auf Agar mit Glukose- oder Dextrinzugabe überimpft, so geschieht es manchmal, daß sich auf diesen Unterlagen Kolonien fremder Bakterien entwickeln, aus denen dann aus Myxobakterienzellen bestehende Schleimstränge hervorbrechen, von denen die einen sich auf der Oberfläche der Platte verbreiten, während die anderen in die Tiefe wachsen. Nach einigen Überimpfungen auf Filtrierpapier und wieder auf eine Agarplatte kann man aus solchen Schleimsträngen reine, von jeder Verunreinigung durch fremde Organismen freie Kulturen von Myxobakterien gewinnen. Auf diese Weise erhielt man Reinkulturen von *S. compositum* Th. und *S. nigrescens* n. sp. Sie bilden den Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Aus dem Biologisch-Botanischen Institut der J. K. Universität Lwów, Polen.

Literatur.

- 1) Geitler L.: Über *Polyangium parasiticum* n. sp. eine submerse parasitische Myxobakterie. Archiv f. Protistenkunde, **50**, 67, 1924. — 2) Jahn E.: Die Polyangiden, Leipzig, 1924. — 3) Jahn E.: (Ref.) Zeitschrift f. Botanik, **17**, 600, 1925. — 4) Kofler L.: Die Myxobakterien der Umgebung von Wien. Sitzber. K. Ak. Wissensch. Mat. Naturw. Kl. Wien, **122**, Abt. I, 845—875, 1913. — 5) Krzemieniewscy H. und S.: Die Myxobakterien von Polen. Acta Soc. Bot. Pol., **4**, 8, 1926. — 6) Krzemieniewscy H. und S.: Die Myxobakterien von Polen. Anhang, Ebenda, **5**, 84, 1927. — 7) Krzemieniewscy H. und S.: Die Myxobakterien von Polen. Ebenda, **5**, Taf. V. Photo 13 und 14, 1927. — 8) Krzemieniewscy H. und S.: Über die Verbreitung der Myxobakterien. Ebenda, **5**, 102, 1927. — 9) Krzemieniewscy H. und S.: Zur Morphologie der Myxobakterienzelle. Ebenda, **5**, 16, 29, 1926. — 10) Quehl A.: Untersuchungen über die Myxobakterien. Zentrabl. Bakt. II Abt., **16**, 29, 1906. — 11) Thaxter R.: On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. Bot. Gaz. **17**, 403, 1892. — 12) Thaxter R.: Notes on the Myxobacteriaceae. Ebenda, **37**, 405—416, 1904. — 13) Vahle C.: Vergleichende Untersuchungen über die Myxobacteriaceen. Zentrbl. f. Bakt. II Abt., **25**, 178, 1909. — 14) Winogradsky S.: Études sur la microbiologie du sol, sur la dégradation de la cellulose dans le sol. Annales de l'Institut Pasteur, **43**, 549, 1929.

Erklärung der Tafeln 2—4.

Tafel 2.

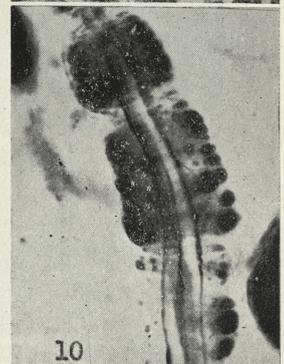
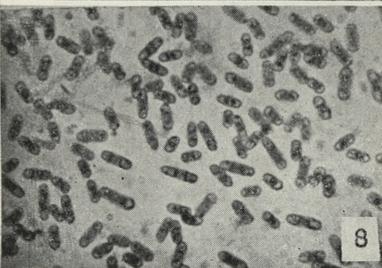
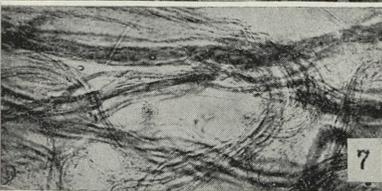
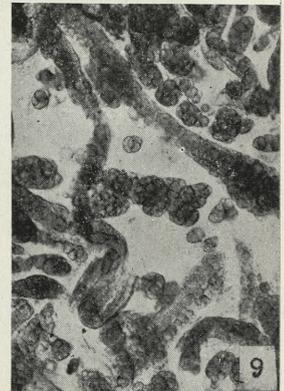
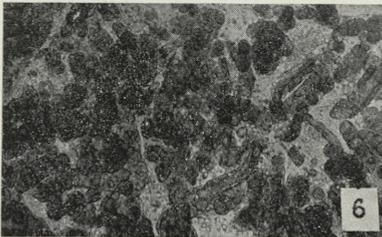
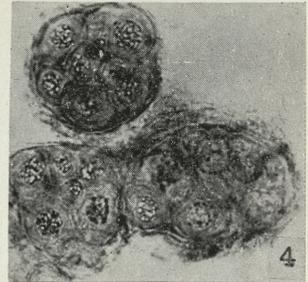
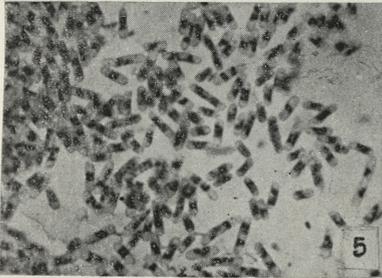
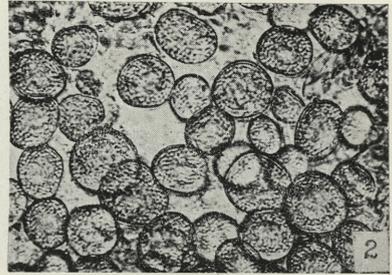
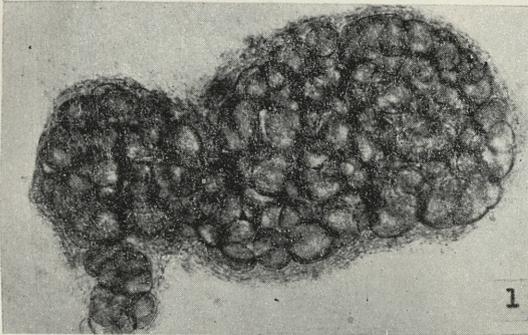
1. *Sorangium compositum* (Th.) Jahn, $\times 230$.
2. " " Sekundärzysten, $\times 500$.
3. " " Primärzysten auf Flachsfasern, $\times 120$.
4. " " Degeneration(?) der Zysten, $\times 500$.
5. " " Vegetative Stäbchen, $\times 1000$.
6. " " Form II, auf Fließpapier, $\times 120$.
7. " " Schleimstränge mit vegetativen Stäbchen.
8. " " Vegetative Stäbchen, $\times 1000$.
9. " " Form III, auf Fließpapier, $\times 120$.
10. " " Eine Flachsfasern mit Schleimsträngen umwunden, $\times 500$.
11. " " Flachsfasern durch *Sor. compositum* halbzersetzt, $\times 500$.

Tafel 3.

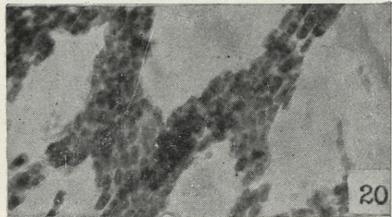
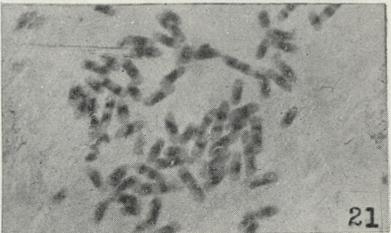
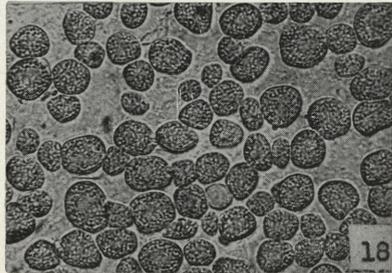
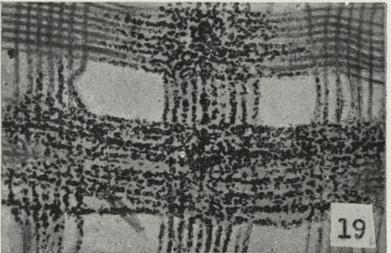
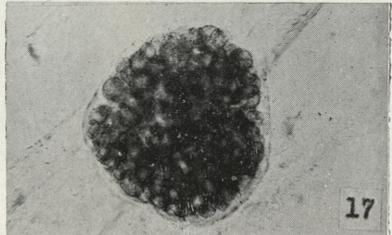
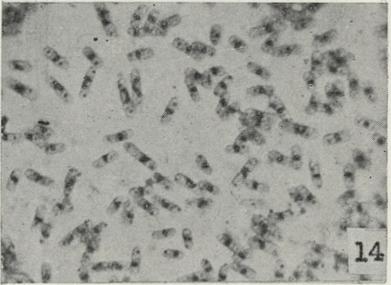
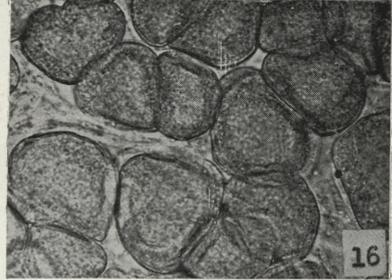
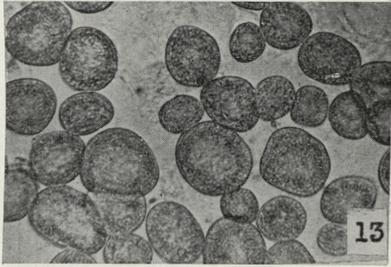
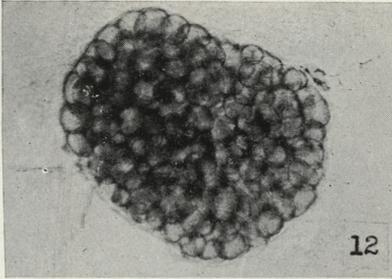
12. *Sorangium spumosum* Form I, $\times 230$.
13. " " Sekundärzysten, $\times 500$.
14. " " Vegetative Stäbchen, $\times 1000$.
15. " " Form II, $\times 240$.
16. " " Sekundärzysten, $\times 500$.
17. *Sorangium nigrescens*, $\times 230$.
18. " " Sekundärzysten, $\times 500$.
19. " " auf einem weitmaschigen Baumwollstoff.
20. " " Schleimstränge mit vegetativen Zellen, $\times 1000$.
21. " " Vegetative Zellen, $\times 1000$.

Tafel 4.

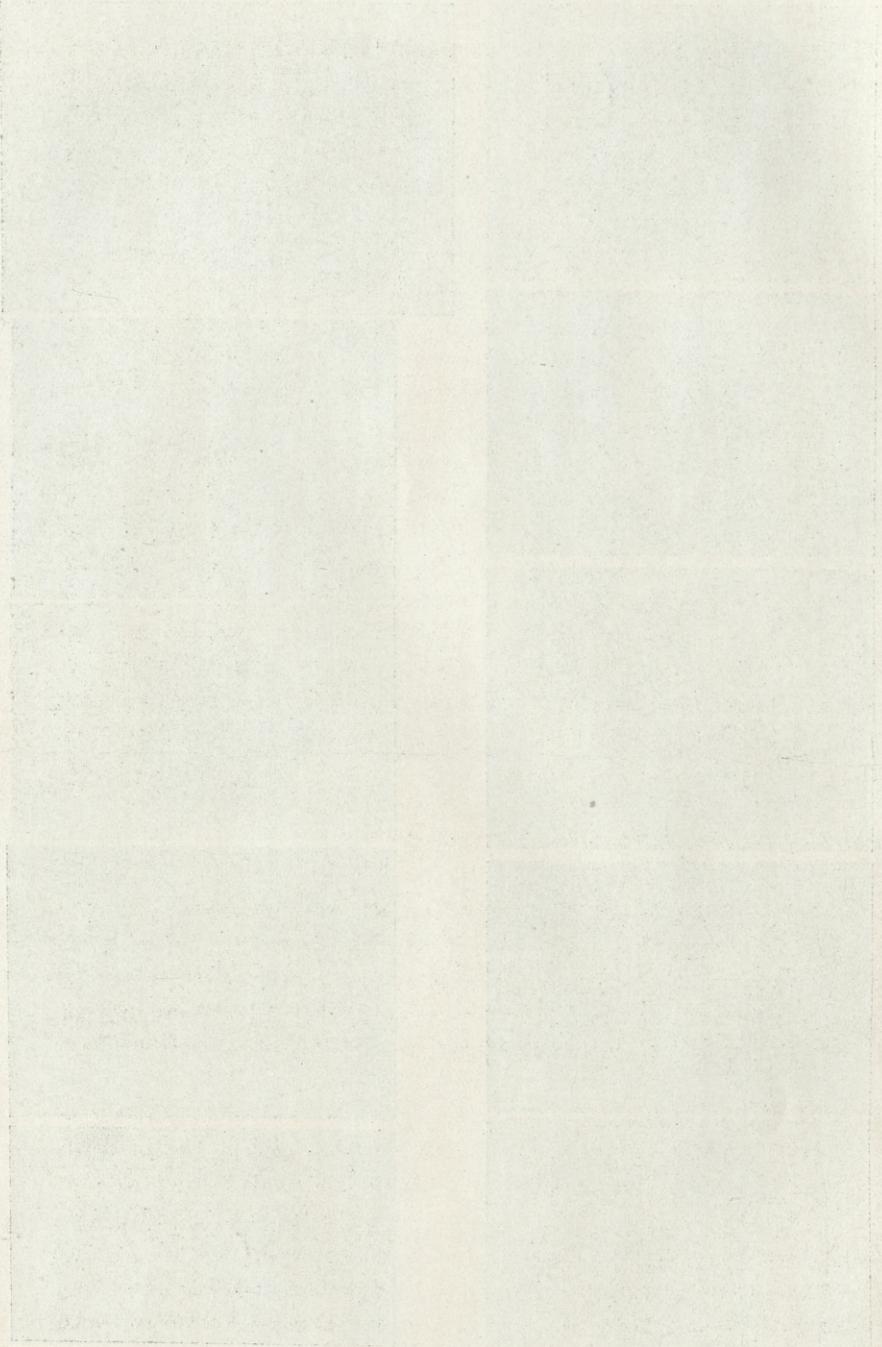
22. *Sorangium nigrum* auf Fasern, $\times 120$.
23. " " in Baumwollhaaren, $\times 160$.
24. " " dasselbe, $\times 500$.
25. " " Eine kolonie auf Baumwollstoff.
26. " " Vegetative Zellen, $\times 1000$.
27. *Archangium* gelbliche Form $\times 50$.
28. " " vegetative Zellen, $\times 1000$.
29. " " rötliche Form, $\times 50$.
30. " " vegetative Zellen, $\times 1000$.
31. *Sorangium nigrum* in der Schleimscheide von verarbeiteter Zellulose.

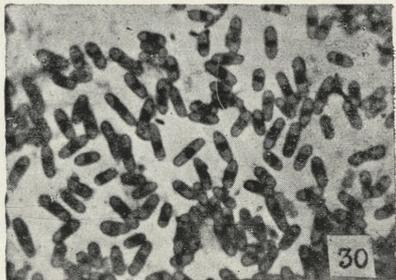
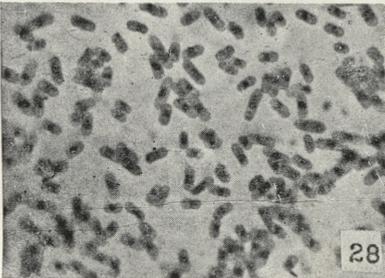
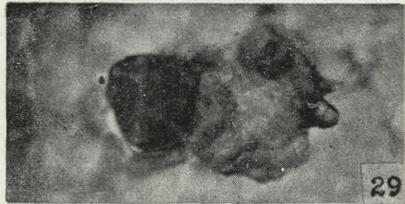
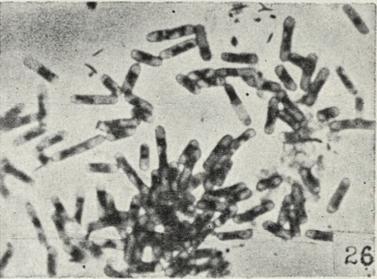
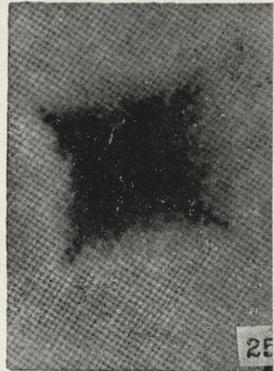
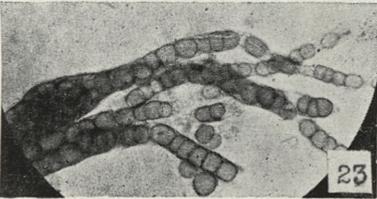
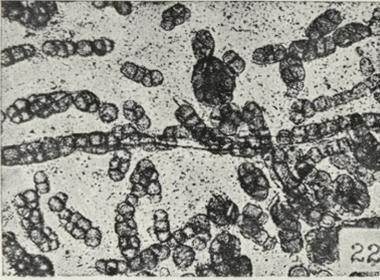


H. und S. Krzemieniewski.

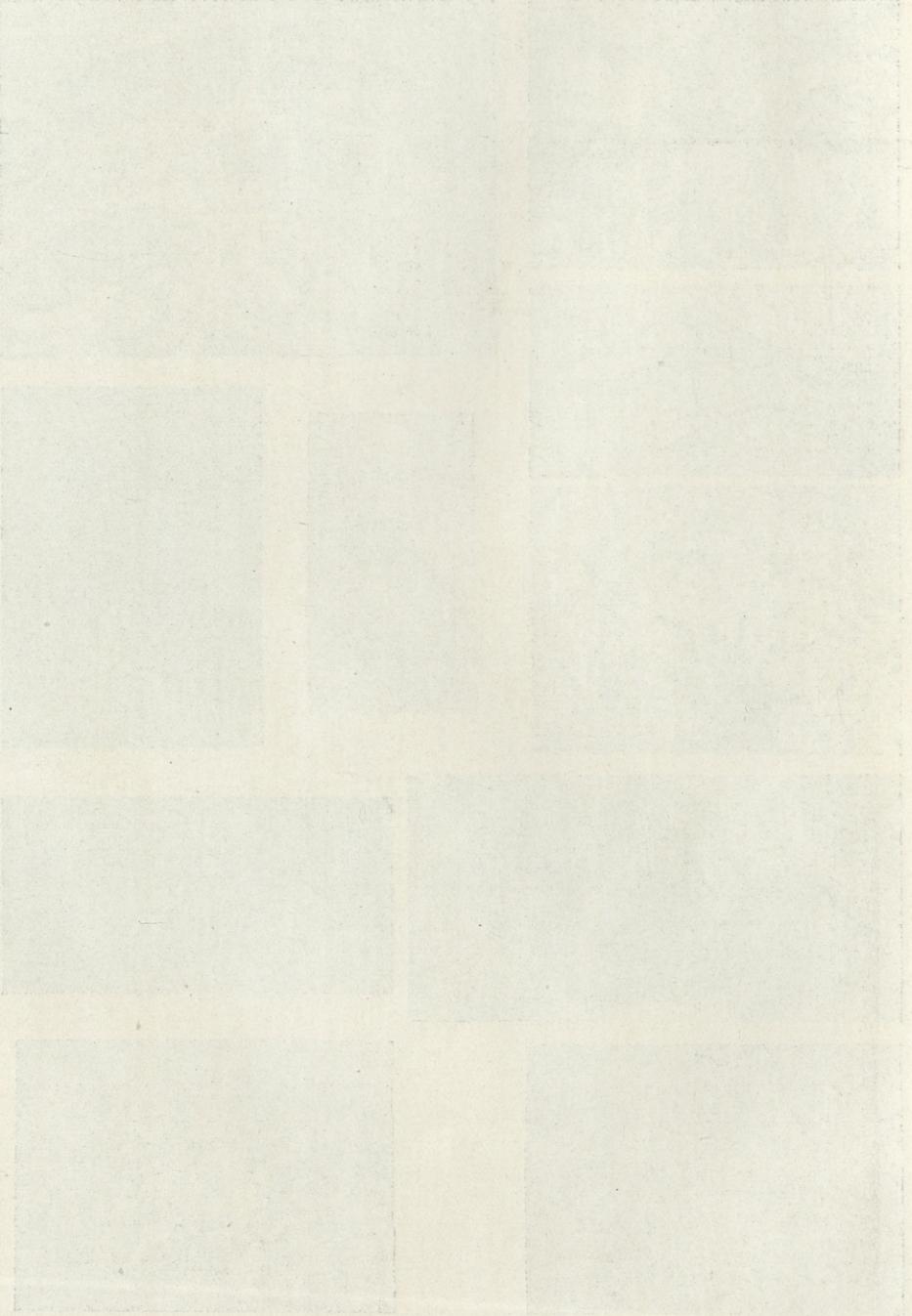


H. und S. Krzemieniewski,





H. und S. Krzenieniewski.



Rozkład błonnika przez Miksobakterie. — Über die Zersetzung der Zellulose durch Myxobakterien.

Mémoire

de M^{me} H. et M. S. KRZEMIENIEWSKI,

présenté le 5 avril 1937, par M. S. Krzemieniewski m. c.

I.

In seiner Monographie über Myxobakterien aus dem Jahre 1924 hat Jahn (3) die Ansicht geäußert, daß es wahrscheinlich keine Myxobakterien gebe, die Holz oder reine Zellulose zu zersetzen imstande wären. In demselben Jahre wurde von Geitler (2) als eine neue Art das *Polyangium parasiticum* beschrieben, das die Fäden von *Cladophora* anzugreifen pflegt und dabei sowohl die Membranen als auch den Inhalt der Zellen zerstört. Es handelt sich dabei, wie die Beschreibung der Art und die diesbezüglichen Zeichnungen vermuten lassen, um eine Myxobakterie aus der Gruppe der *Sorangiaceae*. Zwei Jahre später ist den Verfassern vorliegender Arbeit (6) die besondere Art der Zystenordnung bei *Sorangium compositum* (Th) Jahn, und *Sorangium spumosum* H. u. S. Krzem. aufgefallen, die auf dem Filtrierpapier erschienen sind, womit man die Gefäße auskleidete, in denen man mittels sterilisierten Kaninchenmists aus der Erde Myxobakterien zu gewinnen suchte, und die sich entweder längs der einzelnen Fasern des Filtrierpapiers, oder auch in ihrem Innern zu bilden pflegten. Das mikroskopische Bild (7) dieser Myxobakterien auf Filtrierpapier ließ die Vermutung aufkommen, daß diese Arten gleichfalls zu einer Zersetzung von Zellulose befähigt sind. Diese Vermutung wurde bestärkt, als in einer von den Kulturen, die von Frau Dr J. Ziemięcka (Pulawy) zwecks Aufsuchung von zellulosezersetzenden Bakterien

nach Winogradskys Methode angelegt worden sind, auf Filtrierpapier eine Kolonie von *Sorangium compositum* erschien. Die Wahrscheinlichkeit einer Zellulosezersetzung durch gewisse Myxobakterien wurde somit immer größer. Auf Grund weiterer Untersuchungen konnte erwiesen werden, daß es solche Arten von Myxobakterien, die die Zellulose zu zersetzen vermögen, sogar mehrere gibt. Es ist nämlich gelungen (9), auf künstlichen Nährböden mit Zellulose als einziger Kohlenstoffquelle aus der Erde außer dem *S. compositum* und *S. spumosum* zwei neue Arten von *Sorangium*: *S. nigrescens* und *S. nigrum*, sowie zwei neue Formen von *Archangium* zu gewinnen; es wurden dabei drei Formen von *S. compositum*, sowie zwei Formen von *S. spumosum* isoliert. Zusammen mit Geitlers *Polyangium parasiticum* sind somit zurzeit 10 verschiedene zellulosezersetzende Myxobakterien bekannt¹⁾. Es muß betont werden, daß die Anwendung von Zellulose als Kohlenstoffquelle es zum ersten Male möglich machte *S. compositum* in Kultur zu erhalten, was weder Thaxter (11), der diese Art als erster beschrieben hatte, noch einem anderen Forscher später gelungen ist.

Eine genaue Untersuchung der Zellulosezersetzung durch Myxobakterien ist nur auf Grund von Reinkulturen möglich. Das Reinigen von Rohkulturen stieß lange Zeit auf große Schwierigkeiten. Endlich gelang es *S. compositum* und *S. nigrescens* in Reinkultur zu erhalten; diese Myxobakterien bilden den Gegenstand vorliegender Untersuchungen.

II.

Die Kulturen wurden in Petrischalen angelegt mit Kieselsäuregel als Substrat, dem eine Nährlösung zugesetzt wurde, die in 1000 cm³ destillierten Wassers 10 g KH₂PO₄, 5 g MgSO₄, 5 g NaCl, 0.1 g Fe₂(SO₄)₃ aq und 0.1 g MnSO₄ enthält. Gewöhnlich wurde jeder Platte mit 30 cm³ Kieselsäuregel 1 cm³ dieser Lö-

¹⁾ Während der Korrektur vorliegender Abhandlung sind uns zwei Veröffentlichungen von A. Ivušenecki und L. Solntzeva zugekommen, welche eine Beschreibung von zwei aus Torf isolierten zellulosezersetzenden Myxobakterien enthalten. Die eine Art wird von den Verfassern *Polyangium cellulosum*, die andere *Sorangium cellulosum* benannt. Unseres Erachtens wäre es jedoch besser die erste Art *Sorangium* und die andere *Archangium* zu nennen.

sung, sowie ca 5 mg N in Form von KNO_3 zugesetzt. Auf der Oberfläche der Kieselgallerte wurde Fließpapier oder ein Baumwollstoff ausgebreitet. Zum Impfen wurde junges Material aus Zellulose-Kulturen oder von Glukose-Agarplatten verwendet. Ein solches Vorgehen sicherte besser die Reinheit der Kulturen und kürzte die Dauer der Versuche. In älteren Kulturen, in denen bereits Zysten vorhanden waren, wurden nämlich manchmal stellenweise Verunreinigungen bemerkt; außerdem pflegen die Zysten erst nach einigen Tagen, und dabei oft wie z. B. bei *S. compositum*, sehr unregelmäßig zu keimen. Das Impfmateriale wurde mit einer gebogenen Platinnadel auf der Oberfläche des Nährbodens in Streifen ausgebreitet, wobei immer nur frische Kulturen Verwendung fanden, da die vegetativen Stäbchenzellen das Austrocknen schlecht vertragen. Die an der Luft getrockneten vegetativen Zellen von *S. nigrescens* kommen z. B. schon nach 24 Stunden um, und die Zellen von *S. compositum*, obwohl mehr resistent, waren nach achttägigem Verweilen im Trockenzustande auch nicht mehr entwicklungsfähig. Nur Zysten lassen sich im Trockenzustande als Impfmateriale benutzen, da sie viel widerstandsfähiger sind und das Eintrocknen besser vertragen. So begannen die Zysten von *S. compositum*, die 21 Monate im Trockenzustande aufbewahrt worden sind, auf einen neuen Nährboden übergetragen, sich bereits nach einigen Tagen zu entwickeln, ebenso die eingetrockneten, 27 Monate lang aufbewahrten Zysten von *S. nigrescens*.

Als Erstes wurde angestrebt den Einfluß des Sauerstoffes, der H-Ionenkonzentration, sowie der Temperatur auf die Entwicklung der beiden *Sorangium*-Arten des näheren zu bestimmen.

1. Einfluß von Sauerstoffzutritt. Beide Arten sind streng aerob und werden durch Entzug von Sauerstoff in ihrer Entwicklung gänzlich gehemmt. Junge, 48-Stunden alte, oder soeben geimpfte Kulturen, unter eine Glasglocke gestellt, und durch alkalische Pyrogalllösung des dort befindlichen Sauerstoffes beraubt, vermögen sich nicht zu entwickeln. Die vegetativen Zellen bleiben unter diesen Bedingungen zwar einige Zeit am Leben, jedoch nur dann, wenn der Nährboden KNO_3 enthält. Kulturen von *S. compositum*, die 7—13 Tage lang ohne Sauerstoff waren, entwickelten sich wieder, als sie nach dieser Zeit an die Luft gebracht wurden. Nach 20-tägigem Aufenthalt unter anaeroben Be-

dingungen waren sie aber nicht mehr entwicklungsfähig. *S. nigrescens* bewahrte auf einem Nitrat enthaltenden Nährboden in sauerstofffreier Atmosphäre seine Entwicklungsfähigkeit sogar 20 Tage lang. War aber im Nährboden statt Nitrat Ammoniumsulfat vorhanden, so vermochte sich schon nach 7 Tagen Sauerstoffentzug auch diese Art, als man sie wieder an die Luft brachte, nicht zu entwickeln. Die Nitrate ermöglichen somit vielleicht den Sorangien eine Zeitlang die Atmung; Zellulose können diese Myxobakterien aber ohne Sauerstoffzutritt nicht verarbeiten. Die zur Reduktion von KNO_3 notwendige Energiequelle bilden wahrscheinlich die in den Zellen aufgespeicherten Reservestoffe.

2. Einfluß der H-Ionenkonzentration. Einer Untersuchung des Einflusses der H-Ionenkonzentration stellen sich einige Schwierigkeiten entgegen, weshalb sie nur in ziemlich engen Grenzen ausgeführt werden konnte. Eine $\text{pH} = 8.5$ übersteigende alkalische Reaktion bewirkt eine allmähliche Lösung der Kieselgallerte, was die Entwicklung der Kulturen erschwert. Andererseits erfolgt in Gegenwart von KNO_3 eine sehr schnelle Neutralisierung oder sogar Alkalisierung des anfangs sauren Nährbodens, wodurch die Kulturbedingungen leicht eine Änderung erfahren.

Die Untersuchungen, auf Grund welcher man den Einfluß der Reaktion des Nährbodens auf die Entwicklung der Sorangien festzustellen suchte, wurden an 7-tägigen Kulturen von *S. compositum* und *S. nigrescens* ausgeführt. Tabelle I gibt den Zelluloseverbrauch in mg an.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, entwickelt sich auf einem sauren Nährboden, bei $\text{pH} = 4.5$, das *S. nigrescens* überhaupt nicht und das *S. compositum* nur sehr schwach, da die durch die letztgenannte Art bewirkte Zellulosezersetzung unter diesen Bedingungen nach 7 Tagen nur 18.5 mg beträgt und nach 20 Tagen kaum 66.1 mg erreicht. Als optimal erwiesen sich für beide Arten Nährböden von fast neutraler Reaktion mit $\text{pH} = 6.5 - 8.0$. Auf alkalischem Nährboden von $\text{pH} = 8.5$ ist das Wachstum bereits sichtlich gehemmt; es muß aber bemerkt werden, daß der Nährboden mit der Zeit noch stärker alkalisch wurde und die Kieselgallerte sich zu lösen begann.

3. Einfluß der Temperatur. Um den Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung der Sorangien zu ermitteln, wurden

TABELLE I.

Die Zellulosezerersetzung in 7-tägigen Kulturen bei verschiedener H-Ionenkonzentration.

<i>Sorangium compositum</i>				<i>Sorangium nigrescens</i>			
pH		zersetzte Zellulose mg		pH		zersetzte Zellulose mg	
zu Anfang	am Ende			zu Anfang	am Ende		
4.5	5.0	6.5 ¹⁾	18.5	66.1 ¹⁾	4.5	—	—
5.5	8.0		77.0	80.0	5.5	8.0	69.5 79.5
6.0	8.0		89.0	87.0	6.0	8.5	102.9 104.9
6.5	8.5		100.8	114.0	6.5	9.0	112.1 115.3
8.0	9.0		118.7	116.7	8.0	9.0	119.2 133.7
8.5	9.5		77.4	80.0	8.5	9.5	86.0 99.1

einige Kulturserien angelegt und die Entwicklung der beiden Myxobakterien bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Die Versuchsdauer betrug 20 Tage bei Temperaturen von 7°—21° C, sie war dagegen kürzer bei höheren Temperaturen (bis 42° C) und betrug nur 6 Tage für *S. compositum* und 8 Tage für *S. nigrescens*. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Entwicklung von *S. compositum* und *S. nigrescens* innerhalb der Temperaturgrenzen von 11—40° C erfolgen kann. Bei niedrigen Temperaturen (bis 15° C) wachsen beide Arten ungefähr gleich stark, gegen höhere Temperaturen (von 37° C an) erweist sich *S. compositum* weniger empfindlich als *S. nigrescens*. So zersetzte z. B. *S. compositum* bei 39—40° C in 6 Tagen 63 und 44.1 mg Zellulose, während *S. nigrescens* bei gleicher Temperatur in 8 Tagen kaum 8.4 und 4.9 mg zu zerlegen vermochte. Die Widerstandsfähigkeit der Sorangien höheren Temperaturen (bis 40° C) gegenüber stimmt mit den Angaben Kofler's überein (5), denen zufolge eine zufällige Temperaturerhöhung im Thermostat bis auf 40° C keine Schädigung seiner Myxobakterienkulturen bewirkte.

Als günstig gelten für beide Sorangien die Temperaturen zwischen 30—37° C, wobei das Optimum bei 34—35° C zu liegen

¹⁾ 20-tägige Kultur.

TABELLE II.

Die Zersetzung der Zellulose bei verschiedenen Temperaturen.

t°	Tage	<i>S. compositum</i>		Tage	<i>S. nigrescens</i>	
		Zersetzte Zellulose mg			Zersetzte Zellulose mg	
7—8	20	Kein Wachstum		20	Kein Wachstum	
11—13	»	4·2	4·5	»	4·5	0·7
13—15	»	21·6	35·9	»	25·6	—
19—21	»	175·5	166·9	»	108·1	106·5
26—27	6	91·6	74·0	8	100·6	101·4
28	»	97·9	87·1	»	115·1	91·0
30—32	»	131·5	111·6	»	142·4	118·9
34—35	»	161·0	116·3	»	137·2	155·9
36—37	»	111·6	124·2	»	125·9	112·1
39—40	»	63·0	44·1	»	8·4	4·9
42	»	Kein Wachstum		»	Kein Wachstum	

scheint. In dieser Temperatur schreitet die Zellulosezersetzung, sowie die Entwicklung der Sorangien am schnellsten vor; es muß aber bemerkt werden, daß trotz der augenscheinlich starken vegetativen Entwicklung, die Bildung der Zysten und der Fruchtkörper bei dieser Temperatur für gewöhnlich später erfolgt und diese spärlicher und lose aufzutreten pflegen. Das oben festgestellte Temperaturoptimum bezieht sich somit vorwiegend auf die Zellulosezersetzung.

Es sei hiezu bemerkt, daß unsere Befunde von denjenigen Baur's (1) etwas abweichen, der für andere Myxobakterien die Temperatur von 30—35° C als optimal betrachtet. Sie ähneln dagegen den Befunden von Quehl (10), der die lebhafteste Entwicklung von *Myxococcus*, *Polyangium* und *Chondromyces* bei 35—36° C festgestellt hat. Während aber nach Quehl die untere Temperaturgrenze für *Myxococcus rubescens* zwischen 17—20° C zu suchen ist, liegt diese für unsere Sorangia bei 11° C, demnach viel niedriger. Unsere früheren Versuche (8) haben übrigens gezeigt, daß auch viele andere Myxobakterien, *Myxococcus rubescens* nicht ausgenommen, sich in viel niedrigeren Temperaturen, als Quehl sie angibt, zu entwickeln vermögen, wobei ihr Wachstum aber sehr schwach ist und erst nach längerer Zeit sichtbar wird.

4. Der Nährwert verschiedener Stickstoffquellen. Wenn sich die Myxobakterien auf Kaninchenmist oder Mistagar entwickeln, so können verschiedene, und zwar sowohl organische wie anorganische im Substrat vorhandene Verbindungen als Stickstoffquellen in Frage kommen. Ihre Entwicklung auf Zellulose in Gegenwart von Nitraten oder Ammoniumsalzen beweist noch nicht, daß gerade diese Stickstoffverbindungen ihren Anforderungen am besten entsprechen, um so mehr, als sie bis jetzt oft als unzureichend betrachtet worden sind [Jahn (4)]. Um den Nährwert verschiedener N-Verbindungen für *Sorangium compositum* und *S. nigrescens* des näheren zu ermitteln, wurden in der üblichen Weise auf Kieselsäuregel-Platten Serien von Kulturen angelegt, wobei in die Nährlösung verschiedene N-Verbindungen in ca 5 mg Stickstoff entsprechenden Mengen eingeführt wurden. Diese Versuche wiesen bei Gegenwart von Harnstoff, α -Alanin, Leucin und Zystin keine Entwicklung der Sorangien auf. Auf Taurin war zwar ein ganz schwaches Wachstum, jedoch keine Zellulosezersetzung bemerkbar. Auf Asparagin entwickelten sich beide Arten ziemlich gut, aber dennoch viel schlechter als wenn Nitrate vorhanden waren.

Auf Pepton pflegte sich nur *S. nigrescens* ziemlich gut zu entwickeln, eine Entwicklung von *S. compositum* konnte aber nie festgestellt werden. Auf Ammoniumsulfat vermögen beide Arten sich zu entwickeln, falls der Nährlösung gleichzeitig CaCO_3 zugesetzt wird; sonst wurde die Entwicklung infolge Säuerung des Nährbodens gehemmt. Auch bei Gegenwart von CaCO_3 erfolgte auf Ammoniumsulfat das Wachstum etwas schwächer als auf Nitraten. Die Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle III ersichtlich; die Zahlen bezeichnen in mg den Zelluloseverbrauch in 12-tägigen Kulturen.

Da die Zellulose für die Sorangien keine ausschließliche Kohlenstoffquelle bildet und sie sich, obwohl viel schwächer, auch auf Kosten anderer Kohlenstoffverbindungen entwickeln können, mußte ihr Verhalten verschiedenen Stickstoffquellen gegenüber auch bei Anwesenheit von einem anderen Kohlehydrat z. B. Glukose geprüft werden. Zu diesem Zwecke wurden beide Arten auf 1% Agar mit 0.5% Glukose-Zusatz geimpft. Neben den üblichen Bestandteilen der Minerallösung enthielten die Agarplatten je 10 mg Stickstoff in Form von verschiedenen Verbindungen. Die

TABELLE III.

Der Zelluloseverbrauch in 12-tägigen Kulturen bei Gegenwart verschiedener Stickstoffverbindungen.

Stickstoffquellen	<i>S. compositum</i>			<i>S. nigrescens</i>		
	Zellulose mg			Zellulose mg		
	Anfangs	Übrige- bliebene	Ver- brauchte	Anfangs	Übrige- bliebene	Ver- brauchte
KNO ₃ — 36 mg	286·5	180·2	106·3	289·0	137·8	151·2
	291·6	171·9	119·7	295·0	155·0	140·0
(NH ₄) ₂ SO ₄ — 25·5 mg + CaCO ₃ 100 mg	291·5	200·8	90·7	286·0	189·8	96·2
	304·3	195·5	108·6	309·5	220·5	89·0
Pepton — 33 mg	302·1	300·5	1·6	305·9	222·2	83·7
	304·7	300·7	0·4	287·4	211·5	75·9
Asparagin — 27 mg	291·6	271·0	20·6	299·1	268·5	30·6
	299·8	275·5	24·3	304·0	277·5	26·6

H-Ionenkonzentration des Nährbodens wurde auf pH = 7—8 gebracht. Tabelle IV bringt die Ergebnisse dieser Versuche.

TABELLE IV.

Die Entwicklung der Kulturen auf Agar mit 0·5% Glukose in Gegenwart verschiedener Stickstoffverbindungen.

Stickstoffquelle	<i>S. compositum</i>	<i>S. nigrescens</i>
KNO ₃ — 72 mg	+++	+++
Harnstoff — 22 »	—	—
Leucin — 93 »	—	—
α-Alanin — 64 »	—	—
Zystin — 86 »	—	—
Taurin — 90 »	(+)	+
Asparagin — 54 »	+	++
Pepton — 66 »	—	+

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß *S. compositum* auch in Gegenwart von Glukose die verschiedenen organischen Stickstoffverbindungen nur in geringem Maße für sich verwerten kann; sein Wachstum erfolgte deutlicher nur auf Asparagin; es machte sich auch auf Taurin bemerkbar, jedoch nur in sehr geringfügigem Maße. *S. nigrescens* vermag dagegen bei Gegenwart von Glukose ebenso wie auf Zellulose den Stickstoff nicht nur aus Asparagin und Taurin, sondern auch aus Pepton zu schöpfen, wodurch es sich von *S. compositum* unterscheidet. Die beste Entwicklung beider Arten erfolgte, wie gewöhnlich, auf Nitrat als N-Quelle. Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Nährwert verschiedener N-Verbindungen bei Anwesenheit von Glukose stimmen somit im allgemeinen mit denjenigen überein, die bei Gegenwart von Zellulose als C-Quelle zu verzeichnen waren.

Es muß hier betont werden, daß in Kulturen, die durch fremde Bakterien verunreinigt wurden, *S. compositum* seinen Bedarf an Stickstoff aus Pepton, und beide Sorangien aus Harnstoff decken können. Es liegt die Vermutung nahe, daß in diesem Falle ihre unmittelbare N-Quelle die infolge der Lebenstätigkeit der Bakterien entstehenden Ammoniumverbindungen bilden.

5. Der Nährwert verschiedener Kohlenstoffquellen. Rohkulturen, die auf Agar mit Glukose-Zusatz übergeimpft worden sind, ließen in der Regel kein Wachstum der Sorangien erkennen. Es wurde aus diesem Grunde lange Zeit geglaubt, daß diese Arten ausschließlich auf Zellulose angewiesen sind. Erst nachdem es gelang die beiden Myxobakterien in Reinkultur zu erhalten, zeigte es sich, daß diese Arten sich auch auf Kosten anderer Kohlenstoffverbindungen ernähren können. Auf Agar mit Glukose übergeimpft entwickeln sich Reinkulturen von *S. compositum* und *S. nigrescens* auch ohne Zellulose, und zwar ohne Agar als solchen zu verbrauchen. Nach Überimpfung auf eine Agarplatte mit Mineralnährlösung und KNO_3 bilden die Sorangien um die Impfstelle herum sehr lose Stränge, längs welcher sich bald kleine Fruchtkörper zu bilden beginnen. Auf Agar mit Glukose oder einem anderen ihnen zugänglichen Kohlehydrat bilden sie flache nach unten abgerundete Kolonien. Die aus vegetativen Zellen sich zusammensetzenden Schleimstränge verbreiten sich dabei nicht nur über die Agaroberfläche hin, sondern dringen auch, obwohl nur 1–2 mm tief, in den Agar hinein. Einer Kolonie, die auf einer

Agarplatte gewachsen ist, kann man keine vegetativen Stäbchen entnehmen, ohne daß auch etwas Agar mitgenommen wird. Letzterer ist nämlich von vegetativen Stäbchen durchwachsen, was auch zur Folge hat, daß die Agargallerte dort, wo sich Kolonien von Sorangien gebildet haben, viel härter ist als an anderen Stellen der Platte. Mit der Zeit pflegt an der Stelle, wo die Bildung der Kolonie erfolgte, eine Vertiefung zu entstehen, worauf sich am Rande und in der Mitte der Kolonie im Agar Risse zu bilden beginnen. Es sieht so aus, als ob man es hier mit einem Auflösen des Agars zu tun hätte; diese Annahme wird durch die Tatsache widerlegt, daß solche Risse auch auf Kieselsäureplatten entstehen, und daß ihre Ränder in beiden Fällen immer scharf umrissen in Erscheinung treten. In Kulturen von *S. nigrescens* werden solche Risse im Agar seltener beobachtet; in Kolonien von *S. compositum* sind sie dagegen eine gewöhnliche Erscheinung. Sie werden wahrscheinlich durch starken Wasserverbrauch seitens der vegetativen Zellen, sowie durch ein Zusammenziehen des Schleimes, während dessen Oberfläche trocknet, verursacht. Sie treten später in Erscheinung, falls Platten benutzt werden, die weniger als 1%, und zwar ca 0·8% Agar enthalten.

Um den Nährwert anderer Kohlenstoffquellen zu prüfen, wurden auf Agar und auf Kieselsäuregel parallele Kulturen angelegt, die neben der Minerallösung mit KNO_3 als N-Quelle je 0·5% oder 1% einer von den organischen Verbindungen enthielten, die ausprobiert werden sollten. Die Platten wurden, wie gewöhnlich, mit vegetativen Stäbchen beimpft. Die Entwicklung erfolgte im Thermostat bei 30°C. Die auf Agar und Kieselsäuregel erhaltenen Ergebnisse waren die gleichen. Ihre Zusammenstellung enthält Tabelle V.

Ein Vergleich der Kulturen, die auf Zellulose gewachsen sind, mit denjenigen, die auf anderen Kohlenstoffquellen zur Entwicklung gelangten, ergibt, daß die Entwicklung der Sorangien auf solchen Kohlehydraten wie Glukose, Dextrin oder Maltose, die im allgemeinen als gute, oder sogar sehr gute C-Quellen gelten, immer schwächer fortschreitet als auf Zellulose. Auch die Beobachtung der Fruchtkörperbildung in Kulturen gleichen Alters führt zu dem Schlusse, daß für diese Organismen die Zellulose doch die beste Kohlenstoffquelle bildet. Dank ihrem Vermögen, sich von Zellulose zu ernähren, vermögen die Sorangien sich in

TABELLE V.

Die Entwicklung von *S. compositum* und *S. nigrescens* in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen.

Kohlenstoffquelle	<i>S. compositum</i>	<i>S. nigrescens</i>
Arabinose	+	+
Xylose	+++ (Zysten)	++
Galactose	+	+
Lävulose	+	+
Glukose	+++ (Zysten)	+++ (Zysten)
Saccharose	—	—
Maltose	+++ (Zysten)	+++ (Zysten)
Dextrin	+++ (Zysten)	+++ (Zysten)
Stärke	++	—
Glykogen	+	—
Inulin	—	—
Zellobiose	++	++
Mannit	—	—
Dulcit	—	—

zellulosehaltigen Medien in dem Kampf ums Dasein gegen andere Organismen zu behaupten.

Ein Vergleich der Entwicklung der beiden Sorangien auf verschiedenen Kohlenstoffquellen ergibt, daß diese im allgemeinen für *S. nigrescens* einen geringeren Nährwert besitzen als für *S. compositum*. So kann *S. compositum* z. B. Stärke und Glykogen als C-Quelle benützen, auf welchen *S. nigrescens* sich nicht zu entwickeln vermag. Es sei aber bemerkt, daß die Entwicklung von *S. compositum* auf Stärke-Agar nur langsam erfolgt, wobei sich die Myxobakterien lose über die ganze Platte verbreiten; am Rande der Kolonien werden dabei keine durchsichtigen Säume gebildet, ein Beweis, daß aus den Kolonien in den Agar keine amylytischen Enzyme diffundieren. Xylose bildet für *S. compositum* eine der Glukose gleichwertige C-Quelle; *S. nigrescens* entwickelt sich auf Glukose besser als auf Xylose. Beide Arten entwickeln sich gut auf Dextrin, Zellobiose und Maltose, schwach dagegen auf Arabinose, Galaktose und Lävulose. Keine von ihnen vermag Saccharose, Inulin, Mannit oder Dulcit zu verwerten.

Ihre Unfähigkeit auf Saccharose zu gedeihen ist besonders zu betonen. Es lag anfänglich die Vermutung nahe, der Verbrauch der Saccharose werde vielleicht, obwohl nur schwache Lösungen (0·5% und 1%) Verwendung fanden, durch die Konzentration bestimmt, in der sie in den Nährlösungen geboten wurde. Um diese Frage ins Klare zu bringen wurden Agar-Kulturen angelegt, die 0·1—2% Saccharose aufwiesen. Das Ergebnis war vollkommen eindeutig. Alle Kulturen hatten das gleiche Aussehen: um die Impfstellen herum war ein schwacher Schleier sichtbar; gleich daneben hatten sich im Innern des Agars kleine Fruchtkörper gebildet. Derartige ist immer nach Impfung auf reinen Agar sichtbar, dem es an allen anderen zugänglichen Kohlenstoffquellen mangelt.

Um den Einfluß der Konzentration der für die Sorangien zugänglichen Kohlenstoffquellen auf ihre Entwicklung hin zu prüfen, wurden Serien von Agar-Kulturen mit 0·1—3% Glukosegehalt angelegt. Es zeigte sich, daß *S. compositum* größere Mengen von Glukose zu ertragen vermag, als *S. nigrescens*. Die Bildung der Kolonien von *S. compositum* erfolgt sogar auf einem Nährboden mit 3% Glukosegehalt. Die Kolonien sind aber in diesem Falle klein (0·5—0·7 cm im Durchmesser), gedrängt, im Agar vertieft und bilden keine Fruchtkörper. Auf Platten mit 2·5—1·5% Glukose pflegen die Kolonien größer und loser zu sein, bilden aber gleichfalls keine Fruchtkörper. Die Bildung letzterer erfolgt erst bei 1% Glukosegehalt im Nährboden. Bei noch geringerer, weniger als 1% betragender Konzentration von Glukose wachsen die Kolonien für gewöhnlich schneller; bei 0·1% Glukose breiten sie sich lose aus und bilden nur winzige Fruchtkörper.

Sorangium nigrescens verträgt, wie bereits erwähnt, keine höheren Glukosekonzentrationen. Bei 3% Glukosegehalt entwickelt es sich überhaupt nicht, bei 2·5% läßt sich eine schwache Entwicklung verzeichnen, die Kolonien sind aber klein und bilden keine Fruchtkörper. Die Fruchtkörperbildung erfolgt erst auf Platten mit 1% Glukose. Am besten erfolgt die Entwicklung auf Platten, die 0·5% Glukose enthalten; auf solchen Platten wachsen die Kolonien schnell und bilden die Fruchtkörper schon nach 11 Tagen. Bei 0·1% Glukosegehalt entstehen nur ganz lose, kleine, spärliche Fruchtkörper.

6. Die Auswahl der Kohlenstoffquelle. Bei Gegenwart in der Nährlösung verschiedener Kohlenstoffquellen pflegen die Organismen gewöhnlich zuerst die ihnen am leichtesten zugänglichen auszunützen. In dem Bestreben das Verhalten der Sorangien zweien gleichzeitig gebotenen Kohlehydraten gegenüber zu bestimmen, wurden Kulturen angelegt, die gleichzeitig Zellulose und Glukose, oder Zellulose und Saccharose aufzuweisen hatten. Als Nährboden dienten Kieselplatten, die Glukose oder Saccharose in Mengen von 300, 150 oder 30 mg zugesetzt bekamen, was 1%, 0.5% und 0.1% entsprach, und auf deren Oberfläche Scheiben aus Filtrierpapier von ca 300 mg Gewicht ausgebreitet wurden. Man impfte das Papier, wie gewöhnlich, streifenweise mittels einer gebogenen Nadel. Die Kulturen mit Glukose wurden sodann 7 und 12 Tage lang, diejenigen mit Saccharose 7 und 10 Tage lang im Thermostat bei 28—30°C belassen. Nach dieser Zeit wurde das Papier mit der Kultur vorsichtig von der Kieselgallerte abgehoben, gründlich abgespült, um allen Zucker zu entfernen, sodann bei 110°C getrocknet und gewogen. Die Ergebnisse sind auf Tabelle VI zusammengestellt.

Das Bild, das die Kulturen mit Zellulose und Glukose boten, war nicht in allen Fällen das gleiche, es wechselte vielmehr mit der Menge der Glukose im Nährboden. *S. compositum* entwickelte sich auf dem Nährboden mit 300 mg Glukose in üppiger Weise auf der Papieroberfläche, ohne aber Fruchtkörper zu bilden. Ein Verbrauch von Zellulose war nicht bemerkbar. In Kulturen mit 150 mg Glukose erfolgte die Entwicklung gleichfalls gut, war aber bereits mit Fruchtkörperbildung und schwacher Zellulosezerseztung verbunden. Letztere war nach einigen Tagen an dem Durchscheinen der gegen Licht gehaltenen Fließpapierscheiben zu bemerken. Kulturen mit 30 mg Glukose im Nährsubstrat unterscheiden sich nur in den ersten Tagen von den Kulturen auf reiner Zellulose und stehen ihnen auch, was den Verbrauch von Zellulose anbelangt, nur wenig nach.

Die Kulturen von *S. nigrescens* auf Filtrierpapier mit Glukose boten ein ähnliches Bild, nur daß die Entwicklung schwächer war, wie immer bei Anwesenheit von Glukose. Die Fruchtkörperbildung gestaltete sich im allgemeinen um so besser, je weniger Glukose der Nährboden neben Zellulose enthielt.

TABELLE VI.
Das Verhalten von *S. compostum* und *S. nigrescens* auf Zellulose bei Gegenwart von Zucker als zweiter Kohlenstoffquelle. (Das Gewicht der Filtrierpapierschleiben mitsamt den Kulturen im Vergleich zum Gewicht des Filtrierpapiers zu Anfang des Versuches).

Zuckermenge im Nährboden neben Zellulose mg	<i>Sorangium compostum</i>						<i>Sorangium nigrescens</i>					
	Kulturdauer, Tage:	Zuckerverbrauch	Eingeführte Zellulose mg	Gesamtgewicht der Kultur m. Zell. mg	Gewichtszunahme bzw. Verluste	Kulturdauer, Tage:	Zuckerverbrauch	Eingeführte Zellulose mg	Gesamtgewicht der Kultur m. Zell. mg	Gewichtszunahme bzw. Verluste		
300 mg Glukose	12	teilweise	283.9 288.9	332.9 327.0	+ 49.0 + 38.1	7	teilweise	306.0 308.0	328.2 322.8	+ 22.2 + 14.7		
150 „	„	vollständig	292.5 287.0	262.3 250.4	- 30.0 - 36.6	„	„	305.0 309.0	312.8 316.6	+ 6.9 + 7.6		
30 „	„	„	296.2 287.7	197.2 193.0	- 99.0 - 96.7							
0 „	„	„	288.4 301.7	177.5 187.0	- 110.9 - 114.7							
300 mg Saccharose	10	Zucker vorhanden	292.6 288.3	215.9 210.7	- 80.3 - 77.6	7	Zucker vorhanden	285.5 283.5	196.9 192.4	- 86.6 - 91.1		
150 „	„	„	299.0 302.9	197.6 197.8	- 101.4 - 105.1	„	„	276.7 281.0	191.0 181.8	- 85.7 - 99.2		
0 „	„	„	302.0 289.2	194.7 165.3	- 107.3 - 123.9	„	„	266.2 263.5	181.0 172.8	- 85.2 - 90.7		

Bei 300 mg Glukosegehalt im Nährboden war das Trockengewicht der Kultur samt dem übriggebliebenen Papier bei beiden Sorangien größer als das Gewicht der Papierscheiben am Anfang des Versuches; bei 150 mg Glukose waren nur die 7-tägigen Kulturen von *S. nigrescens* etwas schwerer als das verwendete Filtrierpapier. Diese Gewichtszunahmen sind selbstverständlich durch die Entwicklung der Kulturen auf Kosten von Glukose bedingt bei keiner bzw. bei nur schwach fortschreitender Zellulosezerseztung. Wird die Glukosemenge im Nährboden verringert, so läßt sich keine Gewichtszunahme mehr feststellen, im Gegenteil, es werden immer größere Gewichtsverluste verzeichnet, die Folge einer immer stärkeren Zellulosezerseztung. In ihrer Gesamtheit scheinen diese Versuche zu beweisen, daß *S. compositum* und *S. nigrescens* das Vermögen haben bei gleichzeitiger Darbietung von Glukose und Zellulose sich hauptsächlich auf Kosten der ersteren zu entwickeln.

Anders gestalteten sich die Versuche mit Saccharose. Die Kulturen der beiden Arten boten mit und ohne Saccharose dasselbe Bild. Im Vergleich zu den Kulturen mit 150 mg Saccharosegehalt, sowie mit denjenigen, die der Saccharose vollkommen entbehrten, wurde in den Kulturen von *S. compositum* mit 300 mg Saccharose im Nährboden eine schwächere Entwicklung verzeichnet, wobei auch geringere Gewichtsverluste der trockenen Masse festgestellt wurden. Diese schwächere Entwicklung, sowie die geringere Zellulosezerseztung in den Kulturen mit 300 mg Saccharose sind indessen nicht auf Kosten eines Verbrauches von Saccharose zu setzen, sie werden vielmehr durch ihren schädlichen Einfluß bedingt. Bei einer Menge von 150 mg hatte Saccharose gar keinen Einfluß; der Zelluloseverbrauch war derselbe wie in Kulturen ohne Saccharose, dabei um ca 40% größer als in dem Versuche mit 300 mg Saccharose. In den Kulturen von *S. nigrescens* machte sich ein Einfluß von größeren Saccharosemengen keineswegs bemerkbar; die Gewichtsverluste waren fast immer die gleichen.

Die Ergebnisse dieser Versuche stimmen somit mit den früheren, an Agar-Kulturen gewonnenen Erfahrungen überein. Sie liefern nämlich eine weitere Bestätigung der Tatsache, daß *S. compositum* und *S. nigrescens* die Saccharose nicht verwerten können. Bei einer Konzentration von 1% im Nährboden, beeinflußt

Saccharose in keiner Weise die Kulturen von *S. nigrescens*, wirkt aber etwas hemmend auf die Entwicklung von *S. compositum*.

III.

Über den Stoffwechsel der Myxobakterien ist bis jetzt nur wenig bekannt. Nach den Angaben von Thaxter und anderen Autoren scheiden die Zellen der Myxobakterien Schleim aus; der Schleim umgibt auch ihre Fruchtkörper und bildet bei manchen Arten zystentragende Stiele, die s. g. Zystophoren. Mit Hilfe von Schwefelsäure konnte in den Zellen der Myxobakterien die Anwesenheit von Karotinoiden festgestellt werden, die ihnen meistens eine rötliche Färbung verleihen. Es wurde auch in den Zellen und besonders in den Zysten die Bildung fettartiger Stoffe, die Anhäufung von Glykogen, sowie die Anwesenheit von Volutin nachgewiesen. Alle diese Beobachtungen, die an anderen Myxobakterien gemacht worden sind, bewahren ihre Geltung — wie man sich jetzt überzeugen konnte — auch in Bezug auf die Sorangien. Soviel nach der Reaktion mit JJK zu urteilen ist, pflegt sich Glykogen in größeren Mengen in den Stäbchen vor der Zystenbildung anzuhäufen, in reifen Zysten befindet er sich in viel kleineren Mengen, was Jahns Angaben entspricht.

Fettartige Stoffe treten bei Sorangium-Arten manchmal sogar in größeren Mengen auf, und können bei Anwendung der üblichen Färbungen leicht in den Zysten beobachtet werden. Durch Extraktion mit Äther kann man aus älteren Zysten von *S. compositum* bis 3% Rohfett gewinnen. Aus *S. nigrescens* wird viel weniger Rohfett extrahiert; die Farbe des Ätherextraktes ist dabei strohgelb, während das Extrakt von *S. compositum* eine schöne orangegelbe Färbung besitzt. Diese Färbung stammt zweifelsohne von den Karotinoiden. Es könnte daraus geschlossen werden, daß *S. nigrescens* weniger an Karotinoiden enthält als *S. compositum*. Die Farbstoffe von *S. compositum* sind in Petroläther unlöslich und verleihen der Essigsäure eine kaum merkliche hellgelbe Färbung. Alkohol wird von ihnen deutlich gelb gefärbt. Azeton färbt sich auf eine ähnliche Weise oder vielleicht noch stärker. Die Chloroformlösung hat eine orangegelbe Farbe mit einem Stich ins Rötliche. Benzol färbt sich sehr schwach, noch schwächer der Schwefelkohlenstoff, beide letztgenannten Lösungen haben jedoch einen sehr schwachen Farbton. Allgemein betrachtet, weist das

Verhalten der orangeroten Farbstoffe von *S. compositum* verschiedenen Lösungsmitteln gegenüber auf die Anwesenheit von Karotinoiden hin. Es ist aber nicht klar, aus welchem Grunde der Farbstoff von *S. compositum* in Petroläther und Schwefelkohlenstoff nicht löslich ist. Es besteht die Möglichkeit, daß in ihm die Farbstoffe der Xantophyllgruppe überwiegen. Mit Schwefelsäure verhält sich der Farbstoff der Zysten von *S. compositum* nicht immer auf die gleiche Weise. Manchmal erhält man damit z. B. eine blaue Färbung, ein anderes Mal aber erfährt die Färbung der Zysten keine merkliche Veränderung. Nach Vahle (12) färben sich die Zysten von *Chondromyces crocatus* nach Behandlung mit Schwefelsäure zuerst braungelb, d. h. dunkler als zuvor, um nach einiger Zeit tiefbraun zu werden. Jahn gibt jedoch an, daß sich in jungen Stielen von *Chondromyces aurantiacus* an der Basis, nach Behandlung mit Schwefelsäure, »ein fahler grünlicher Schein« bemerkbar macht, während oben, wo sich schon bereits die Zysten zu bilden beginnen, der gelbrote Farbton erhalten bleibt und sogar etwas heller wird. Jahn ist der Ansicht, daß die Änderungen in der Färbung durch die Oxydation des Karotins verursacht werden, welches an dem Zustandekommen der endgültigen rötlichen oder bräunlichen Farbe der Zysten mitbeteiligt sein soll. Das Verhalten von *S. compositum* gegenüber der Schwefelsäure entspricht ungefähr den Angaben Jahns. Nur junge Kulturen ergeben mit Schwefelsäure eine tief indigoblaue Farbe. Unter dem Mikroskop sieht man dann, daß diese Reaktion vor allem die die Zellulosefasern bedeckenden vegetativen Stäbchen ergeben. In Entstehung begriffene Fruchtkörper nehmen nach Schwefelsäurezusatz eine grünlichblaue Farbe an, die älteren behalten dagegen in Schwefelsäure ihre rote Farbe bei, nur daß diese greller, eigentlich blutrot wird. Durch Behandlung von jungen, von den Kieselplatten abgenommenen und im Vacuum getrockneten Kulturen mit Schwefelsäure erhält man eine dunkle, indigoblaue Lösung. An den Wänden des Gefäßes, in dem die Reaktion erfolgte, machen sich dann kirschrote Klümpchen bemerkbar; es sind dies die älteren Fruchtkörper, die durch Schwefelsäure nicht mehr blau gefärbt werden. Die abfiltrierte blaue Lösung enfärbt sich nach Verdünnung mit Wasser, wobei ein flockiger, orange-gelber Niederschlag ausgeschieden wird. Ältere Kulturen färben sich, wie schon erwähnt, mit Schwefelsäure blutrot. Dieser Farbstoff löst

sich in der Säure auf. Bleibt die Lösung einige Zeit offen an der Luft stehen, so wird aus ihr gleichfalls ein flockiger, orangegelber Niederschlag ausgeschieden. Wird nun einem Tropfen der Säure, in dem etwas von diesem Niederschlag, die übriggebliebenen Fruchtkörper vorhanden sind, eine Spur von FeSO_4 zugesetzt, so wird die Farbe des Niederschlages blaugrün und die der Fruchtkörper grünlichblau. Dasselbe wird erreicht, wenn man den Niederschlag mit einer Eisennadel in einem Tropfen von Schwefelsäure umrührt. Ferrisulfat bewirkt keine Umfärbung des Niederschlages. Es könnte somit angenommen werden, daß die Farbenveränderung der älteren Fruchtkörper von Rot zu Blau in Schwefelsäure nach Eisenzusatz durch Reduktion bewirkt wurde. Jedenfalls kann man bei dieser Farbenveränderung keine Reaktion auf Gerbstoffe annehmen, weil das Blaugrünwerden des Niederschlages und der Fruchtkörper auch nach Zusatz von Zinkstaub an Stelle von Eisen auftritt. Diese blaue Färbung hält nicht an. Bei Luftzutritt werden die in der Schwefelsäure verbleibenden Fruchtkörper, sowie auch der Niederschlag himbeerrot. Dieselbe Färbung nehmen auch die Zysten an, die in dem Niederschlage vorhanden sind, der von der Schwefelsäure abgeschieden wurde.

Junge Kulturen von *S. nigrescens* ergeben mit Schwefelsäure keine blaue Färbung. Offenbar scheinen in ihnen die Karotinoide, falls sie überhaupt vorhanden sind, ganz in den Hintergrund zu treten.

Charakteristisch ist auch das Verhalten der Färbung von *S. compositum* bei Zusatz von NaOH oder KOH. Nach Vahle wird die Farbe der Zysten von *Chondromyces crocatus* unter Einwirkung von 25% KOH grauschwarz. Ähnlich verhalten sich die Zysten von *S. nigrescens*: dunkelgrau von Natur aus, werden sie nach KOH-Zusatz noch dunkler. Gleichzeitig gehen manche Stoffe in Lösung über, jedoch nur in kleinen Mengen. Durch Chlorwasserstoff- oder Schwefelsäure wird aus der KOH-Lösung ein flockiger, bei *S. nigrescens* gelbbrauner, bei *S. compositum* rotbrauner Niederschlag gefällt, wobei aber die Farbenunterschiede zwischen beiden Arten nur geringfügig sind. In KOH löst sich dieser Niederschlag fast vollkommen auf. Im Lichte dieser Befunde werden die auf Agar und Kieselsäureplatten mit Kulturen von *S. compositum* bei Anwesenheit von KNO_3 festzustellenden Färbungen

leicht verständlich. Die roten Farbstoffe der Kulturen dringen durch Diffusion in die alkalisch reagierende Gallerte ein und färben diese grau. Werden die graugewordenen Platten mit Salz- oder Schwefelsäure behandelt, so bekommen sie sofort eine rote Färbung.

Die Färbung der Fruchtkörper der Sorangien stammt hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich von den farbigen äußeren Hüllen einzelner Zysten, oder ihrer Ansammlungen. Die angeführten Beobachtungen betreffen demnach nicht nur die Farbstoffe der Zysten, sondern auch des Schleimes, der sie unmittelbar umgibt, und sogar Hüllen um sie bildet.

Der Schleim ist bekanntlich ein ständiges Produkt der Myxobakterien. Falls diese Zellulose verarbeiten, enthalten ihre Kolonien Schleimstoffe doppelter Herkunft; außer der von den Zellen ausgeschiedenen, vom Substrat unabhängigen Schleimsubstanz bildet sich infolge der Zellulosezersetzung noch eine weitere, die dem Nährboden entstammt. Die folgenden Untersuchungen werden sich somit auf zwei verschiedene Schleimarten beziehen.

Der in den Sorangienkulturen infolge der Zellulosezersetzung entstehende Schleim hat das Vermögen im Wasser anzuquellen, und sich dann beim Eintrocknen wieder zusammenzuziehen. Für Methylenblau besitzt er kein besonderes Fixierungsvermögen. Wird eine Kultur auf Fließpapier mit einer Lösung von Methylenblau übergossen und nach einiger Zeit mit Wasser ausgewaschen, so bleiben nur die Ränder der Kolonien, wo vegetative Zellen in großer Zahl angehäuft sind, stark gefärbt; die unzersetzte Zellulose, sowie der in der Mitte der Kolonie sich befindliche Schleim färben sich viel schwächer. Mit $\text{CuSO}_4 + \text{KOH}$ färbt sich der Schleim himmelblau, mit Jod — gelb, desgleichen auch mit Jod und ZnCl_2 ; mit Methylorange + NaCl ergibt er keine Farbenreaktion, dagegen eine schöne und haltbare Färbung mit Rutheniumrot; im Schweizerschen Reagens ist er unlöslich; er gehört somit höchstwahrscheinlich zu den sog. Pektoseschleimen.

Um die Zellulosezersetzung durch die Sorangien des näheren zu untersuchen, wurden auf mit Scheiben von Baumwollstoff bedeckten Kieselsäureplatten Kulturen beider Arten angelegt, wobei man sich kleiner Petrischalen bediente, und nach Ablauf der Versuchszeit die Kulturen zwecks weiterer Untersuchung vereinigte. Man gab kleineren Kulturen aus diesem Grunde den Vorzug, weil

sie größere Gewähr für die Reinheit der Kulturen zu bieten schienen, und durch Abimpfen auf Agar mit Glukose in dieser Hinsicht leichter zu überprüfen waren. Absolute Sicherheit konnte zwar auch auf diese Weise nicht erzielt werden, da jedoch mit Hilfe vom Mikroskop keine fremden Bakterien nachgewiesen werden konnten, so konnten diese, auch wenn sie in verschwindend kleiner Zahl vorhanden wären, keinen merklichen Einfluß auf die Ergebnisse der Versuche ausüben. Die Platten wurden, wie gewöhnlich, mit vegetativen Stäbchen aus jungen, auf Filtrierpapier oder Baumwollstoff herangezuchteten Kulturen beimpfte, wobei das Impfmateriale mit einer gebogenen Nadel in breiten Streifen über die Stoffoberfläche verteilt wurde. Die Entwicklung der Kulturen erfolgte bei 34—35° C. Nach Verlauf von 6—9 Tagen wurden sie vom Gel abgenommen, in Schalen übertragen und sodann zerrieben, wobei man die übriggebliebenen Stoffreste durch Abwaschen möglichst genau abzusondern trachtete. Der unverbrauchte Stoff wurde bei 110° C getrocknet, das Spülwasser dagegen samt den Kulturen und dem Kieselsäuregel auf Stickstoffverbindungen untersucht, und zwar mit Diphenylamin auf Nitrate, mit Griess-Romijn Reagens auf Nitrite, und mit Nessler's Lösung auf Ammoniak. Auf Grund der Ergebnisse dieser Vorprüfungen wurden weitere quantitative Bestimmungen von Stickstoff ausgeführt.

In Kulturen mit KNO_3 wurden schon nach einigen Tagen Nitrite festgestellt. In den Kulturen von *S. compositum* pflegte die Reaktion immer sehr schwach, oft sogar zweifelhaft zu sein, letzteres in dem Falle, wenn nach Zusatz des Reagens von Griess nur eine schwache, rötliche Färbung erschien. In den Kulturen von *S. nigrescens* war aber bereits nach 48 Stunden die Reaktion auf Nitrite deutlich positiv, nach 3—4 Tagen sogar sehr stark, besonders wenn den Kulturen mehr Nitrat geboten wurde, z. B. in einer Menge von 10 mg Stickstoff auf je eine Platte mit 30 cm³ Kieselsäuregel. In an Nitrat ärmeren Kulturen, die z. B. nur 5 mg Stickstoff aufwiesen, war die Reaktion viel schwächer. In an Stickstoff reicheren Kulturen konnten nach 6—9 Tagen im Kieselsäuregel auch Spuren von Ammoniak festgestellt werden. In Kulturen mit 5 mg N in Form von Nitrat, war eine Anhäufung von Ammoniak nicht sichtbar. Das positive Ergebnis mit dem Griess'schen und dem Nessler'schen Reagens scheint darauf hinzuweisen, daß vor ihrer Assimilation durch die Sorangia die Nitrate eine Re-

duktion erleiden. Nach einiger Zeit sind im Kieselsäuregel der Kulturen keine anorganischen Stickstoffverbindungen nachweisbar.

Die Stickstoffumwandlungen und der Zelluloseverbrauch in Sorangien-Kulturen sind beispielweise in Tabelle VII zusammengestellt.

TABELLE VII.

Vergleichende Kulturen von *S. compositum* und *S. nigrescens* auf Nährböden mit Kaliumnitrat und Ammoniumsulfat bei Anwesenheit von CaCO_3 . Versuchsdauer 9 Tage bei 34—35° C.

Kulturen von	Zellulose			Stickstoff			Zelluloseverbrauch auf je 1 Teil Stickstoff
	Bei Beginn mg	Rest mg	Zer-setzte mg	Bei Beginn mg	Gefunden		
					anorgani-scher mg	organi-scher mg	
<i>Sorangium compositum</i>	1559.5	270.5	1289.0	43.2 als KNO_3	0.6 als Nitrat, 2.1 als Ammoniak	40.08	32.1
	1900.2	628.2	1272.0	44.8 als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5 als Ammoniak	42.7	29.8
<i>Sorangium nigrescens</i>	1982.9	345.7	1636.5	47.2 als KNO_3	—	46.9	34.9
	1892.0	431.9	1460.5	44.8 als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.6 als Ammoniak	43.1	33.9

Aus den oben angeführten Zahlen folgt, daß die Art der Stickstoffverbindungen im Nährboden, sofern es sich um Ammoniumsalze oder Nitrate handelt, auf die Zellulosezerersetzung von keinem sichtbaren Einfluß ist. In beiden Versuchen mit KNO_3 war die Menge der verbrauchten Zellulose ungefähr um 7% größer als in den Versuchen mit Ammoniumsulfat, wobei jedoch der Zelluloseverbrauch von *S. nigrescens* denjenigen von *S. compositum* um 20% überstieg. Die Bilanz des Stickstoffes schließt mit einem Defizit von 0.1—0.6 mg. Diese kleinen Unterschiede befinden sich innerhalb der Fehlergrenze und liefern einen genügenden Beweis, daß in den Kulturen neben der Nitratreduktion keine Denitrifikation erfolgt. Der in die Kulturen eingeführte Stickstoff wurde größtenteils, und zwar in 94—99% in Form von organischen und

zwar hauptsächlich (bei *S. compositum* in 90—92%, bei *S. nigrescens* in 87·1—87·3%) unlöslichen Verbindungen wiedergefunden. Auf einen Teil assimilierten Stickstoffes wurden 29·8—34·9 Teile von Zellulose verarbeitet. Bei einer längeren Dauer des Versuches, oder in Kulturen mit kleineren Stickstoffmengen konnte dieser Koeffizient bis auf 42 ansteigen.

In den von den Zelluloseresten abgesonderten und gewaschenen Kulturen wurde, in Prozenten ihrer Trockenmasse ausgedrückt, ein Stickstoffgehalt von 7·2—8·9% bei *S. compositum* und 7·2—9·5% bei *S. nigrescens* festgestellt.

Das Bestreben, die Zwischenprodukte des Zelluloseabbaus in den Kulturen der Sorangien ausfindig zu machen, führte manchmal zu positiven Ergebnissen. Als Beispiel möge ein Versuch mit 6-tägigen Kulturen von *S. compositum* und *S. nigrescens* auf Leinwand angeführt werden. In diesem Versuche bemühte man sich die Menge des verbrauchten Stoffes zu ermitteln, sodann das Reduktionsvermögen des übriggebliebenen Stoffes zu bestimmen, letzteres sowohl unmittelbar nach dem Versuche wie auch nach vorhergehender Hydrolyse; dieselben Bestimmungen wurden sodann mit den von dem Stoff abgesonderten Kulturen ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf Tabelle VIII wiedergegeben.

Der am Ende der Versuchszeit übriggebliebene Stoff war, was sein Reduktionsvermögen anbetrifft, von dem unbenutzten nur wenig verschieden. Diesbezügliche Versuche erwiesen nämlich, daß 1 g unbenutzten Stoffes aus Fehlingscher Lösung unmittelbar 1·6 mg Cu, nach Hydrolyse aber 64·2 mg Cu auszuschleiden vermag, was mit den entsprechenden, in der Tabelle wiedergegebenen Zahlen übereinstimmt. Die Kultur als solche, d. h. die Fruchtkörper mit dem Schleim, reduzierte die Fehlingsche Lösung unmittelbar nur in sehr geringem Maße, etwas stärker jedoch nach Hydrolyse. Es würde daraus folgen, daß in den Kulturen Stoffe entstehen, die erst nach Hydrolyse ein Reduktionsvermögen zeigen. Nach der Menge des ausgeschiedenen Cu zu urteilen, würde in dem angeführten Versuche die Menge dieser Stoffe nahezu 1/4 g der verwendeten Zellulose entsprechen. In anderen Versuchen kam es vor, daß die Kulturen die Fehlingsche Lösung unmittelbar überhaupt nicht reduzierten und sich nach Hydrolyse wechselnde Ergebnisse feststellen ließen. Die in diesen Versuchen etwas größeren Cu-Mengen sind vielleicht durch Spuren von un-

TABELLE VIII.

	<i>S. compositum</i>	<i>S. nigrescens</i>
1. Der übriggebliebene Stoff in mg .	726·5	709·4
2. Die durch den übriggebliebenen Stoff aus Fehlingscher Lösung ausgeschiedene Cu-Menge	Spur	—
3. Die durch den übriggebliebenen Stoff nach Hydrolyse aus Fehlingscher Lösung ausgeschiedene Cu-Menge in mg	46·2	51·3
4. Die auf 1 g des übriggebliebenen Stoffes entfallende Cu-Menge in mg	63·6	72·3
5. Der zersetzte Stoff in mg	428·5	491·2
6. Die durch die vom Stoff getrennte Kultur aus Fehlingscher Lösung ausgeschiedene Cu-Menge in mg	2·2	5·2
7. Dasselbe nach vorhergegangener Hydrolyse	16·5	20·2

zersetzter Zellulose bedingt, die in den von dem Nährboden losgelösten Kulturen trotz aller Sorgfalt stellenweise doch vorhanden sein konnten.

Flüchtige Säuren, oder außerhalb der Kolonien wirksame Zytasen, denen in besonderen Versuchen nachgeforscht wurde und in denen junge, üppig wachsende Kulturen Verwendung fanden, wurden nicht gefunden.

Zusammenfassung.

Die Myxobakterien *Sorangium compositum* und *Sorangium nigrescens* zersetzen bei Sauerstoffzutritt die Zellulose und gelangen auf dieser als der einzigen Kohlenstoffquelle zur vollen Entwicklung. Sauerstofffreie Atmosphäre kann von ihnen längere Zeit

hindurch nur dann ertragen werden, wenn ihnen im Nährboden Nitrate zur Verfügung stehen; Zellulose wird bei Sauerstoffentzug nicht verarbeitet. Für die beiden obengenannten Sorangien bildet Zellulose die beste Kohlenstoffquelle. Auf Glukose, Maltose, Dextrin, Zellobiose und Xylose gestaltet sich ihre Entwicklung etwas nachteiliger, noch schwächer auf Lävulose und Arabinose, am schwächsten auf Galaktose. Auf Stärke und Glykogen vermag sich nur *S. compositum* und zwar nur schwach zu entwickeln, auf Saccharose, Inulin, Mannit und Dulcit vermag keine von den beiden Arten zu gedeihen. *S. nigrescens* verträgt andere Kohlenstoffquellen außer Zellulose etwas schlechter als *S. compositum*. Die letztgenannte Art vermag auch leichter eine stärkere Glukosekonzentration (3%) zu ertragen, obwohl für eine normale Zystenbildung eine schwächere Konzentration sich als vorteilhafter erweist. Die Entwicklung beider Organismen auf Zellulose bei Anwesenheit von Glukose oder Saccharose ist nicht vollkommen die gleiche: bei 1% Glukosegehalt in der Nährlösung entwickelt sich *S. compositum* in üppiger Weise und verarbeitet keine Zellulose; der Zelluloseverbrauch wird sichtbar erst bei 0.5% Glukose, und gestaltet sich auf Nährboden mit 0.1% Glukosegehalt nahezu ebenso gut wie auf reiner Zellulose. *S. nigrescens* entwickelt sich bei Anwesenheit von Glukose schlechter. Eine Zugabe von 1% Saccharose zu einem Zellulose-Nährboden scheint auf die Entwicklung von *S. compositum* ein wenig hemmend zu wirken, bei 0.5% Saccharosegehalt im Nährboden erfolgt der Zelluloseabbau durch *S. compositum* nicht schlechter als auf reiner Zellulose, jedenfalls läßt sich kein Einfluß von Saccharose auf die Entwicklung der Kulturen feststellen.

Die besten N-Quellen für *S. compositum* und *S. nigrescens* in einem Zellulose-Nährboden bilden die Nitrate und die Ammoniumsalze. Organische N-Verbindungen sind beiden Arten wenig zugänglich. Ihre Entwicklung auf Asparagin z. B. erfolgt sehr schwach, Pepton kann nur von *S. nigrescens* verwertet werden. In verunreinigten Kulturen vermögen beide Arten sich auf Harnstoff zu entwickeln, *S. compositum* außerdem auf dem ihm sonst unzugänglichen Pepton.

Die für beide Organismen günstigste H-Ionenkonzentration bewegt sich in den Grenzen $\text{pH} = 6.5 - 8.5$. Das Temperatur-Minimum liegt für die Entwicklung der Sorangien bei 11°C , das Tem-

peraturmaximum bei 40° C Als optimal gilt für die Zellulosezer-
setzung die Temperatur von 34—35° C, doch macht sich bei die-
ser Temperatur eine Hemmung der Fruchtkörperbildung bemerk-
bar. Eine Temperatur von 40° C vermag *S. compositum* besser zu
ertragen als *S. nigrescens*.

Als Produkte der Stoffumwandlungsprozesse sind bei den My-
xobakterien die in ihren Zellen oft festzustellenden, fettartigen
Stoffe, das Glykogen, das Volutin, sowie der von den Zellen aus-
geschiedene Schleim bekannt. Dieselben Stoffe werden auch bei
den Myxobacteriaceen der Familie *Sorangiaceae* festgestellt. In
jüngeren Zysten findet man mehr Glykogen, in den älteren mehr
von den fettartigen Stoffen.

Die Färbung der vegetativen Stäbchen sowie der jungen Zy-
sten ist, wie es scheint, zum größten Teil durch die Karotinoiden
bedingt. Reife Zysten ergeben jedoch mit Schwefelsäure keine
blaue Färbung. Die Fruchtkörper von *S. compositum* nehmen nach
Behandlung mit Schwefelsäure eine blutrote Farbe an. Dieser Farb-
stoff ist in Schwefelsäure löslich; nach einiger Zeit wird aus solch
einer Lösung ein orangegelber Niederschlag ausgeschieden. Wird
der Schwefelsäure FeSO_4 oder Zinkstaub zugesetzt, so färben sich
sowohl der Niederschlag als auch die Zysten blau, was die Ver-
mutung aufkommen läßt, daß die Farbstoffe der Zysten ein Pro-
dukt der Karotinoidenoxydation sind. Die unter Einwirkung von
 H_2SO_4 und FeSO_4 entstandene Färbung wandelt sich allmählich
in eine himbeerrote. Die graublau gefärbte *S. nigrescens*
wird durch Schwefelsäure nicht verändert.

Unter Einwirkung von NaOH oder KOH nehmen die orange-
roten Fruchtkörper von *S. compositum* eine graubraune Farbe an,
die Zysten von *S. nigrescens* werden dunkler. Die Farbstoffe lö-
sen sich etwas in KOH, und werden nach Zusatz von Säuren aus
dieser Lösung in Form von gelbbraunen Niederschlägen gefällt.

Die orangeroten Farbstoffe von *S. compositum* sind schwer
löslich in Essigsäure und Alkohol, leichter in Azeton, leicht in
Äther und in Chloroform, wobei die Lösung im letztgenannten
Falle einen Stich ins Rote aufweist. Sie sind fast unlöslich in
Benzol, Schwefelkohlenstoff und Petroläther. Es hat den Anschein,
als ob sie nicht von Karotin im eigentlichen Sinne abstammen
würden, womit auch ihr Blutrotwerden unter Einwirkung von kon-
zentrierter Schwefelsäure erklärt werden kann.

Im Laufe der Zellulosezersetzung durch die Sorangien wird eine Schleims substanz gebildet, deren Eigenschaften den sog. Pektoseschleimen entsprechen. Die Kulturen haben manchmal das Vermögen die Fehlingsche Lösung in sehr geringem Maße zu reduzieren; nach Hydrolyse ist ihr Reduktionsvermögen etwas größer. Die Anwesenheit von flüchtigen Säuren konnte in den Kulturen nicht festgestellt werden.

Sorangium compositum und *S. nigrescens* bewirken eine Reduktion von Nitraten, verursachen jedoch keine Denitrifikation. Der in die Nährlösung in Form von Nitraten oder Ammoniumsalzen eingeführte Stickstoff wird in den Kulturen in Gestalt von organischen, und zwar meist unlöslichen Verbindungen fast vollständig wiedergefunden. Die Trockensubstanz der Kulturen enthält 7·2—9·5% Stickstoff.

Auf einen Teil des assimilierten Stickstoffes verarbeiten die Sorangien 30—35 Teile Zellulose. In älteren, an Stickstoffmangel leidenden Kulturen wird dieser Koeffizient etwas größer.

Zellulosespaltende, aus den Kulturen in den Nährboden diffundierende Enzyme, konnten nicht festgestellt werden.

Unsere früheren Untersuchungen haben den Nachweis erbracht, daß die Myxobakterien ständige Bodenbewohner sind; die vorliegende Arbeit beweist nun, daß die Myxobakterien aus der Gattung *Sorangium* vor allem den Abbau von Zellulose bewirken, und diese als Kohlenstoffquelle verwerten, dabei den Stickstoff in Form von anorganischen Verbindungen aufnehmen. Es besteht somit die Möglichkeit, diese Organismen auf einem synthetischen Nährboden zu kultivieren. Ihr Anteil an dem Kreislaufe der Stoffe in der Natur wird auf diese Weise aufgeklärt.

Aus dem Biologisch-Botanischen Institut der J. K. Universität. Lwów (Polen).

Literatur.

1. Baur E. Myxobakterien-Studien. Arch. f. Protistenkunde **5**, 92, 1905. — 2. Geitler L. Über *Polyangium parasiticum* n. sp. Arch. f. Protistenkunde **50**, 67, 1924. — 3. Jahn E. Die Polyangiden, Leipzig s. 95, 1924. — 4. Jahn E. Kulturmethoden und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxobakterien. Abderhalden. Handb. d. Biol. Arbeitsmethoden Abt. XII, T. 2, 921, 1935. — 5. Kofler L. Die Myxobakterien der Umgebung von

Wien. Sitzber. d. K. Akad. Wiss. Wien. Math. Natur. Klasse **122**, Abt. 1, 845, 1913. — 6. Krzemieniewscy H. i S. Die Myxobakterien von Polen, Anhang. Acta Soc. Bot. Pol. **5**, 84, 1927. — 7. Krzemieniewscy H. i S. Ebenda. Tafel V, Photo 13 u. 14, 1927. — 8. Krzemieniewscy H. i S. Die Myxobakterien von Polen, Ebenda, **4**, 1, 1926; Anhang. Ebenda **5**, 79, 1927; Über die Verbreitung der Myxobakterien. Ebenda **5**, 102, 1927; Die Myxobakterien von Polen III. Ebenda, **7**, 250, 1930. — 9. Krzemieniewski H. i S. Die zellulosezersetzenden Myxobakterien, Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1937. — 10. Quehl A. Untersuchungen über die Myxobakterien. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **16**, 9—34, 1906. — 11. Thaxter R. Notes on the *Myxobacteriaceae*. Bot. Gaz. **37**, 413, 1904. — 12. Vahle C. Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriazeen und Bakteriazeen u. s. w. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **25**, 178, 1909.

Z cytologii drożdży. — Sur la cytologie des Levures.

Mémoire

de **M. J. BADIAN**,

présenté le 5 avril 1937, par M. S. Krzemieniewski m. c.

(Planche 5).

I. Introduction.

La structure de la cellule des Levures a depuis longtemps éveillé l'intérêt des cytologues. Après que Mölier eût définitivement établi la présence d'un noyau dans la cellule des Levures (1893), on fixa l'attention sur la structure du noyau et les changements de la chromatine au cours du développement des Levures. Nous citons les principaux travaux qui se rapportent à ce sujet. Selon Dangeard (1893), le noyau est limité par une membrane nucléaire, et contient un grand nucléole. Bouin (1897), Janssens (1893), Janssens et Leblanc (1898) décrivent la structure du noyau de la même manière. Guilliermond (1902, 1903) a décrit d'abord deux types de structure du noyau: 1) le nucléohyaloplasme limité par une membrane, avec un nucléole et des filets ou granules de chromatine, et 2) le nucléohyaloplasme limité par une membrane et un granule chromatique unique ressemblant au nucléole, qu'il a nommé chromoblaste ou caryosome. Il a pourtant constaté ensuite que le chromoblaste est réellement un nucléole, et a abouti à la conclusion que dans les cas où le noyau ne permet d'apercevoir qu'un seul nucléole, la chromatine existe cependant, mais n'est pas visible à cause de sa petite quantité et des petites dimensions du noyau. La structure des Levures ne diffère pas de celle des autres champignons. Selon Swellengrebel (1905) le noyau des Levures a une structure chromatique très irrég-

gulaire, et quelquefois on peut apercevoir aussi le nucléole. Selon Fuhrmann (1906) le noyau des Levures contient de très petits granules, parmi lesquels on en distingue un de plus grandes dimensions qu'on peut regarder comme nucléole. Guilliermond (1910) décrit encore une fois le noyau comme étant formé d'un nucléohyaloplasme incolore entouré d'une membrane colorée, d'un gros nucléole et d'une charpente chromatique plus ou moins visible. Wingard (1925) décrit le noyau de *Nematospora* comme un corpuscule composé d'un nucléole prenant une coloration foncée, d'un réseau de chromatine un peu plus clair et d'une membrane.

Certains auteurs décrivent autrement la structure du noyau des Levures. Wager (1898), Wager et Peniston (1910), dont Guilliermond soumet les idées à une juste critique, étaient d'avis que le noyau des Levures se compose de deux parties: d'une vacuole nucléaire renfermant des granules de chromatine et du nucléole. Feinberg (1902) qui, après Ziemann (1898) et Zettnow (1899), a employé la méthode de coloration de Romanowsky, nie l'existence du nucléole dans le noyau. Kohl (1908) est d'avis que le noyau des Levures se compose d'une membrane, de liquide nucléaire et d'un grand cristal d'albumine qui, selon lui, est le corpuscule décrit comme nucléole par d'autres. Selon Henneberg (1912) on peut distinguer dans le noyau des Levures une partie semi-lunaire ou de forme ovale, qui se colore plus fortement, et le reste du noyau qui prend une faible coloration. M^{me} Rochlin (1933) qui la première a réussi à colorer le noyau des Levures en appliquant la méthode de Feulgen, le décrit comme un corpuscule vésiculeux avec un segment qui donne une réaction nucléale positive. Sur les figures qu'elle reproduit, ce segment a la forme d'un croissant.

Möller (1893), Buscalioni (1896), Buscalioni et Casagrandi (1898), Kohl (1908), Henneberg (1912) étaient d'avis que le noyau des Levures se divise par amitose. Janssens (1893) affirmait que la division du noyau s'effectue par mitose. Janssens et Leblanc (1898) constataient chez *S. cerevisiae* l'amitose pendant le bourgeonnement, tandis que chez *S. Ludwigii* ils observaient un processus intermédiaire entre la caryocinèse et l'amitose. De l'avis de ces auteurs la membrane nucléaire disparaît pendant la division, les granules de chromatine se disséminent dans le plasme, puis le nucléole se divise. Autour des

deux nucléoles-fils les granules de chromatine commencent à se rassembler de nouveau. Hofmeister (1900), Hirschbruch (1902), Marpmann (1902), Wager et Peniston (1902) admettaient l'existence de la caryocinèse chez les Levures.

Swellengrebel (1905) et Fuhrmann (1906) ont décrit chez les Levures une mitose, pendant laquelle il se forme un fuseau mitotique et des chromosomes au nombre de 4 qui se divisent ensuite à leur tour. Guilliermond (1903, 1913) était d'avis que le noyau se divise par étranglement pendant le bourgeonnement des levures. Il a constaté toutefois dans l'asque de *Schizosaccharomyces octosporus* des divisions rappelant une mitose (1917). Cet auteur était cependant d'avis que les chromosomes sont trop petits pour qu'on puisse les compter. Dans son dernier travail sur les Levures (1936) l'auteur admet comme probable que la division du noyau cellulaire de *Saccharomyces paradoxus* pendant le bourgeonnement s'effectue pourtant par une mitose assez semblable à celle que l'on a décrite chez les Ustilaginales quoiqu'elle manifeste apparemment tous les signes de l'amitose. Kater (1928) pense que le noyau de *S. cerevisiae* se divise par mitose et déclare que le nombre des chromosomes est $n=8$. Winge (1935) qui emploie dans ses recherches la méthode modifiée de Feulgen, annonce un travail sur ce sujet.

Le travail présent a été précédé par des travaux sur la cytologie des Myxobactéries, des Bactéries et des Actinomycètes [Badian (1930—36)]. Ceux-ci ont fourni la preuve que ces organismes, quoique dépourvus de noyau cellulaire, renferment des chromosomes en forme de courts bâtonnets à bouts épaissis, situés librement dans le plasme. Durant la division des cellules, les chromosomes se divisent longitudinalement, puis pendant la fécondation qui s'effectue par autogamie et après une division préalable, ils se fusionnent deux à deux en chromosomes bivalents. Pendant la réduction, les chromosomes bivalents se transforment en chromosomes univalents par deux divisions successives. Une partie seulement de ces derniers participe au développement postérieur de l'organisme, tandis que le reste dégénère. La réduction de la chromatine et la formation des chromosomes univalents commence l'haplophase qui dure jusqu'à l'autogamie; la diplophase s'étend de l'autogamie jusqu'à la réduction de la chromatine.

Nous citons ces résultats car, quoique leur sujet soit différent, ils ne sont pas sans valeur comme on va le voir, quand il s'agit de porter un jugement sur les résultats de nos observations concernant les Levures.

II. Le matériel et la technique des recherches.

Nous avons fait nos observations sur *Schizosaccharomyces Pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, que nous avons étudiés pendant leur développement végétal, durant la formation des spores et la germination de celles-ci. Nous étudiâmes en outre les cellules de *Saccharomyces Ludwigii* pendant leur développement végétal ainsi que les cellules végétales de la levure dite «rose» qui ne forme pas de spores. On triturerait le matériel sur les lamelles et le fixait à l'état humide par les vapeurs d'acide osmique à 1 p. c. qui, comme l'ont montré nos recherches sur les Bactéries et les actinomycètes, possèdent la propriété de décolorer les préparations colorées avec la solution de Giemsa. Sur des préparations faites avec soin on remarque, après la différenciation par l'éosine et après la régression du colorant bleu, les noyaux colorés en rouge vif sur le fond du plasmе incolore. Après une action quelque peu prolongée de l'éosine, les noyaux se décolorent à leur tour, ce qui prouve que leur couleur rouge n'est pas attribuable à l'éosine employée pour la différenciation. Si l'on prolonge encore l'action de l'éosine, celle-ci colore en rose uniforme le plasmе de la cellule, mais les noyaux sont généralement déjà complètement décolorés à cet état. L'application de cette méthode de différenciation aux Levures n'est pas toujours facile, mais exécutée soigneusement, elle donne des préparations très finement et distinctement différenciées, qui rendent possible l'observation des détails de la structure des cellules. Notons le fait intéressant qu'on peut obtenir les mêmes images, quoique moins claires, sans différenciation préalable par l'éosine, en soumettant les préparations colorées avec le liquide de Giemsa à l'action des rayons ultraviolets. Le colorant bleu est alors plus rapidement détruit que le colorant rouge, de sorte que dans la cellule uniformément bleue auparavant apparaît le noyau coloré en rouge.

A côté de la coloration par le liquide de Giemsa on a appliqué également la réaction de Feulgen d'après la méthode de M^{me} Rochlin [fixation par les vapeurs de l'acide acétique gla-

cial, plongement dans l'alcool, hydrolyse pendant 4—6 minutes à l'aide d'acide chlorhydrique normal à la température de 60° C., coloration au réactif de Schiff, préparé avec de la fuchsine diamantée (Diamantfuchsin, Grübler]. Les images obtenues grâce à l'application de ce procédé, contrôlé aussi par M. Andrusiw (Lwów), s'accordent en tout point avec les images obtenues en se servant du liquide du Giemsa.

Pour déceler la volutine on a appliqué du bleu de méthylène et de l'acide sulfurique à 1 p. c.; pour colorer les corps lipidiques on se sert de Soudan III, enfin on eut recours à l'iode pour découvrir le glycogène.

III. Schizosaccharomyces Pombe.

La structure de la cellule végétative. Dans les préparations colorées au liquide de Giemsa et différenciées à l'éosine on voit au milieu de la cellule allongée le noyau coloré en rouge (Pl. 5, microphot. 1). En outre la cellule contient d'habitude de petits granules rouges et des granules jaunâtres qui ne se colorent pas par le liquide de Giemsa. Ceux-ci forment souvent avec les granules colorés de plus grands amas aux deux pôles de la cellule (Fig. 1a). Traité par de l'acide sulfurique à 1 p. c., le noyau se décolore complètement, tandis que les petits granules colorés ne disparaissent pas, mais se colorent au contraire plus fortement et ressortent plus distinctement. Ce sont donc des granules de volutine. Ils sont plus vite décolorés par l'éosine que la chromatine, aussi disparaissent-ils après quelque temps dans les préparations ainsi différenciées. On peut facilement distinguer la chromatine de la volutine dans les préparations sur lesquelles agissent en même temps l'éosine et l'acide sulfurique à 1 p. c. Dans ce but on met sur l'un des bords de la lamelle une petite goutte d'acide, et une goutte d'éosine du côté opposé. Seule la volutine devient visible du côté humecté d'acide, tandis qu'on ne voit la chromatine, qui se décolore également dans la suite, que du côté où agit l'éosine. Dans la partie médiane de la préparation sont visibles alors les noyaux colorés en rouge et les granules de volutine bien plus foncés, d'un rouge-bleuâtre. Les granules jaunâtres non colorés par le liquide de Giemsa sont des corps lipidiques. Le noyau cellulaire peut être coloré en appliquant la méthode de Feulgen.

Comparé avec les dimensions de la cellule, le noyau est petit. Sa forme est d'habitude ronde; il est soit uniformément coloré (Fig. 1b), soit la substance colorée s'amasse d'un côté en forme de croissant (Fig. 1a, Pl. 5, microphot. 1). Du côté opposé on remarque généralement alors un petit granule, souvent attaché par un mince fil à l'un des bouts du croissant. On n'a pas réussi à constater la présence d'une membrane nucléaire. Il importe cependant de mentionner que lorsque le noyau est différencié en parties dont l'une colorée, l'autre incolore, celle-ci se détache sur le fond du plasme qui l'entoure. On n'a pas établi la présence d'un nucléole, si toutefois il n'est pas identique à la partie qui ne se colore pas avec le liquide de Giemsa.

Le noyau des cellules jeunes, c'est-à-dire issues avant peu d'une division, a un aspect différent. Sa forme est d'habitude quadrilatérale; après une différenciation plus prolongée le noyau apparaît composé de deux chromosomes en forme de courts bâtonnets à bouts grossis (Fig. 1c, Pl. 5, microphot. 4—6). Quant à la forme et aux dimensions, ces chromosomes correspondent en tout point à ceux des Bactéries, des Myxobactéries et des Actinomycètes.

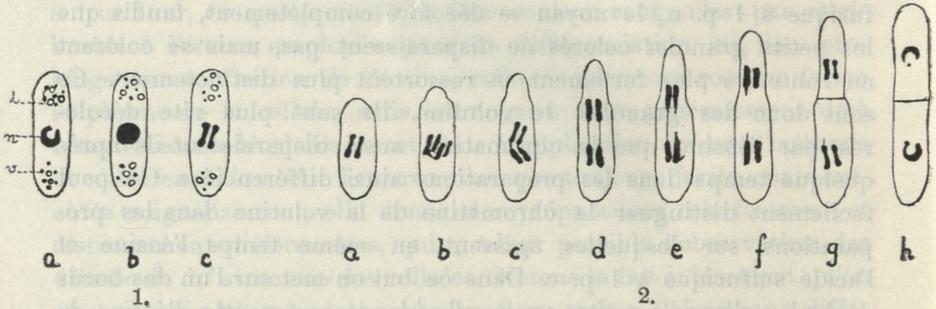


Fig. 1. *Schizosaccharomyces Pombe*. Cellules végétatives, n = noyau, v = volutine, l = corps lipidiques.

Fig. 2. *Schizosaccharomyces Pombe*. Division de la cellule.

La division végétative. Elle comprend: 1) la croissance de la cellule à son extrémité; 2) la division du noyau; 3) la division du plasme et la formation de la cloison transversale. Le moment de la division du noyau cellulaire n'est pas strictement défini. La division peut se produire soit avant l'allongement de

la cellule, soit — plus fréquemment — à l'époque de la croissance, soit lorsque l'allongement a déjà eu lieu. Elle ne se produit d'habitude pas à la limite des deux cellules, mais à l'intérieur de la cellule-mère, d'où part un noyau qui se dirige vers la cellule-fille. Il advient parfois que le noyau de la cellule-mère se déplace vers la partie en croissance. La division du noyau se produit alors à l'intérieur de la jeune cellule, puis l'un des noyaux-fils retourne dans la vieille cellule. Pendant la division du noyau les deux chromosomes se divisent longitudinalement (Fig. 2 b). Les quatre chromosomes-fils demeurent d'abord groupés ensemble. Le noyau est alors relativement grand et, étant insuffisamment différencié, il a la forme d'une boule uniformément colorée; après une différenciation plus prolongée on peut souvent distinguer les bâtonnets de chromatine dont il se compose. Après la division des bâtonnets de chromatine, les chromosomes-fils commencent à s'éloigner les uns des autres deux par deux. Ces couples forment d'abord un angle obtus (Fig. 2 c), puis elles se rangent le long de l'axe de la cellule et se dirigent vers ses deux pôles. Les chromosomes de la même origine, c'est-à-dire issus de la division du même chromosome, sont d'abord reliés par de minces fils de chromatine (Fig. 2 d, microphot. 2). A mesure que les chromosomes s'éloignent l'un de l'autre, les fils se rompent, l'un d'habitude plus tôt que l'autre (Fig. 2 e, microphot. 3). Après la rupture du second fil, on voit souvent ses restes former une espèce d'allongement du chromosome (Fig. 2 f, microphot. 4, 5, 6). Les deux couples de chromosomes s'étant définitivement déplacés, le plasme se divise et la cloison transversale se forme (Fig. 2 g, microphot. 7).

Lorsqu'une deuxième division ne suit pas immédiatement la première, les noyaux quadrilatéraux des jeunes cellules se transforment en noyaux ronds de repos. Les chromosomes placés l'un près de l'autre se recourbent en arc et entourent d'une demi-lune une partie incolore. Cette courbure se communique aussi aux restes du fil rattachant les chromosomes de la même provenance, comme si elle était la conséquence d'un tour du noyau (Fig. 2 h). Ce fil dégénère lentement ensuite. Le processus est accompagné d'une condensation en granule de la substance du fil à l'extrémité de celui-ci. Le granule est d'abord rattaché au reste de la chromatine, puis il s'en détache. Il disparaît complètement dans la suite ou il est écarté au cours de la division suivante de la cellule.

Il résulte de la marche de ces transformations que les trois formes du noyau décrites ci-dessus constituent trois phases différentes de développement. Le noyau quadrilatéral à chromosomes distincts est la forme juvénile du noyau, qui témoigne que la cellule s'est divisée avant peu. Le noyau à chromatine en forme de demi-lune, tel que l'a dessiné M^{me} Rochlin dans ses préparations colorées d'après la méthode de Feulgen, est un noyau de repos. Les grands noyaux pleins, qu'on pourrait prendre pour la forme-type, sont caractéristiques pour la phase précédant la division de la cellule et se composent d'un nombre double de chromosomes situés tout près l'un de l'autre.

La fécondation, la réduction de la chromatine et la formation des spores. La formation des spores chez *Schizosaccharomyces Pombe* est précédée du phénomène de la fécondation, bien connu grâce aux travaux de Guilliermond: deux cellules s'unissent et forment un asque en contenant une à quatre spores. Aussi bien des cellules de provenance différente (isogamie) (Fig. 3 a—g) que des cellules issues de la division d'une seule cellule-mère (adelphogamie) peuvent s'unir (Guilliermond 1903). Dans le premier cas la forme de l'asque peut être différente et dépendre de la position réciproque des cellules qui s'unissent; on peut cependant y distinguer d'habitude deux parties plus larges, jointes par un canal de communication (Fig. 3 d, microphot. 10—20). Dans le second cas l'asque a la forme d'une cellule allongée, mais elle est généralement plus longue que la cellule végétative (Fig. 3 h—n, microphot. 9, 21). Les phénomènes cytologiques accompagnant l'isogamie et l'adelphogamie sont les mêmes. Ils consistent en la fusion des noyaux des deux cellules en un seul, suivie de deux divisions (mitotiques chez *Schizosaccharomyces octosporus* de l'avis de Guilliermond), dont une est regardée comme réductive. Autour de chacun des 4 noyaux-fils se forme une spore.

La découverte des chromosomes de Levures en forme de courts bâtonnets décrits ci-dessus, pose la question de savoir, comment ces chromosomes se comportent au moment de la fusion des noyaux. Il fallait surtout se convaincre, si la fusion des noyaux consiste en la formation d'un noyau dont le nombre de chromosomes est double comme chez les plantes supérieures, ou s'il s'agit de l'union des chromosomes deux par deux, comme chez les Myxobactéries, les Bactéries et les Actinomycètes; en d'autres termes,

il fallait savoir, si le noyau du zygote se compose de 4 chromosomes ou de 2 chromosomes bivalents.

Ce problème n'est pas facile à résoudre. Une observation détaillée des phases particulières du processus permet pourtant d'établir comment se déroulent les phénomènes.

La caryogamie se produit d'habitude dans le canal réunissant les deux cellules, plus rarement à l'intérieur d'une des gamètes. Quand ils se rapprochent l'un de l'autre, les noyaux sont placés de la sorte, que leurs chromosomes se rencontrent par les bouts (Fig. 3 c, d, j, k). Après la rencontre des deux noyaux, chaque chro-

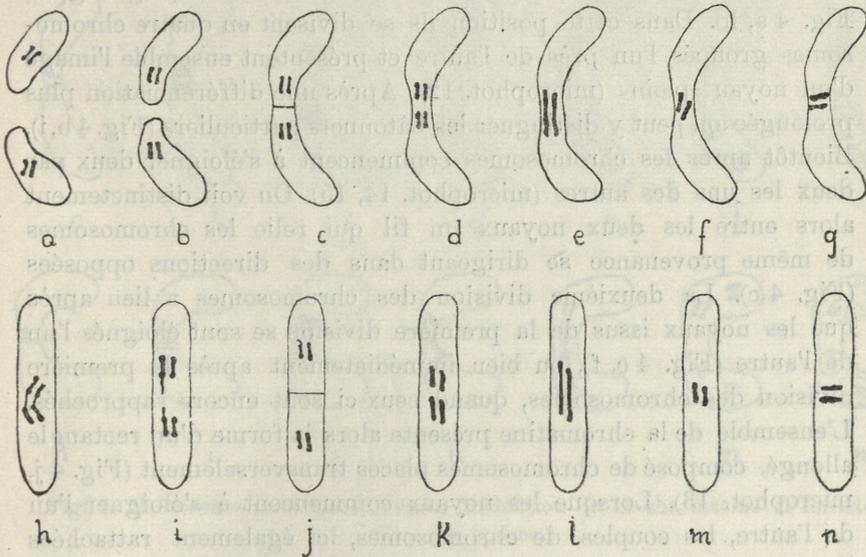


Fig. 3. *Schizosaccharomyces Pombe*. Fécondation.

mosome de l'un se confond avec un chromosome de l'autre pour former un seul fil de chromatine deux fois plus long que chaque chromosome à part¹). Les deux fils de chromatine sont d'habitude parallèles et si rapprochés, qu'il est difficile de les distinguer (microphot. 10). Dans les préparations suffisamment différenciées on aperçoit pourtant l'étroite fente qui les sépare (Fig. 3 e, l, microphot. 9, 11).

Dans la phase suivante les fils de chromatine deviennent peu à peu plus courts et plus gros; ils se transforment donc en bâ-

¹) Des fils pareils se voient sur les figures de M. Guilliermond, qui illustrent la caryogamie chez les levures (1903, 1905, 1936).

tonnets, pourtant encore plus longs que les chromosomes des cellules végétatives; ces bâtonnets continuent à se raccourcir et prennent enfin l'aspect normal de chromosomes (Fig. 3 f, m, microphot. 11).

Ainsi finit la fécondation. Son résultat est le noyau du zygote composé de deux chromosomes bivalents. Immédiatement après se produisent les divisions qui commencent la sporulation.

Voici le cours de ces divisions: les chromosomes bivalents du noyau du zygote accomplissent une rotation de 90° et se placent transversalement dans le canal de communication (Fig. 3 g, n, Fig. 4 a, h). Dans cette position ils se divisent en quatre chromosomes groupés l'un près de l'autre et présentent ensemble l'image d'un noyau »plein« (microphot. 12). Après une différenciation plus prolongée on peut y distinguer les bâtonnets particuliers (Fig. 4 b, i). Bientôt après les chromosomes commencent à s'éloigner deux par deux les uns des autres (microphot. 14, 15). On voit distinctement alors entre les deux noyaux un fil qui relie les chromosomes de même provenance se dirigeant dans des directions opposées (Fig. 4 c). La deuxième division des chromosomes a lieu après que les noyaux issus de la première division se sont éloignés l'un de l'autre (Fig. 4 e, f), ou bien immédiatement après la première division des chromosomes, quand ceux-ci sont encore rapprochés. L'ensemble de la chromatine présente alors la forme d'un rectangle allongé, composé de chromosomes placés transversalement (Fig. 4 j, microphot. 13). Lorsque les noyaux commencent à s'éloigner l'un de l'autre, les couples de chromosomes, ici également rattachés l'une à l'autre par des fils, se placent en zigzag (Fig. 4 k) et forment dans la suite un fil légèrement ondulé, double en réalité, mais qui d'habitude paraît unique. Ce fil, bien plus long que ceux à l'époque de la caryogamie, et formé de quatre paires de chromosomes, se redresse peu à peu et l'on voit sur son parcours des renflements qui correspondent aux chromosomes, ainsi que des parties plus minces formées par les fils reliant les chromosomes de la même provenance (Fig. 4 l). Dans la suite ces fils se cassent et autour des noyaux libérés, dont chacun contient deux chromosomes, commencent à se former les spores (Fig. 4 f, g, m, n, microphot. 16). Le nombre des chromosomes dans le noyau d'une spore et la présence des fils qui relient d'abord les noyaux provenant de la première division, aussi bien que ceux de la seconde,

est une nouvelle preuve que la fusion des chromosomes a lieu au moment de la fécondation. Chaque fil est une preuve que les chromosomes qu'il relie sont issus de la division d'un même chromosome-parent. Il ne serait guère possible d'expliquer la présence des fils, si l'on admettait qu'à l'époque de la fécondation les noyaux des deux cellules ne s'unissent qu'en un seul à double nombre de chromosomes et que ceux-ci ne se confondent pas, mais'éloignent ensuite deux par deux les uns des autres pendant la division du noyau.

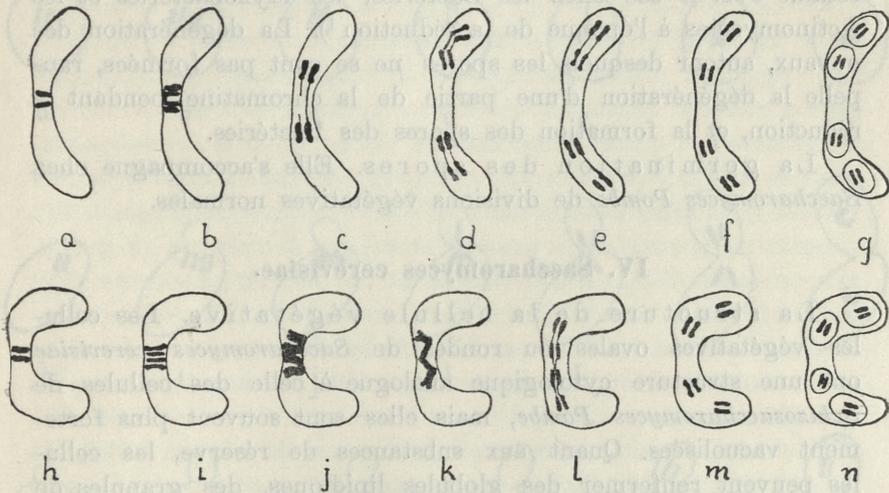


Fig. 4. *Schizosaccharomyces Pombe*. Réduction de la chromatine et formation des spores.

Les quatre spores formées dans l'asque sont d'habitude de la même grosseur. Il arrive pourtant maintes fois qu'une ou deux spores soient de beaucoup plus petites que les autres (microphot. 17, 18). Parfois même le nombre de spores est au-dessous de la quantité normale; il y a donc des asques contenant trois, deux, voire même une seule spore. On voit alors dans l'asque à côté des spores un, deux ou trois noyaux, autour desquels les spores ne se sont pas formées (microphot. 19, 20). Ces noyaux dégèrent et disparaissent peu à peu.

En jugeant de la valeur de ces phénomènes il ne faut pas perdre de vue, que, aussi bien chez les Levures que chez les autres ascomycètes, la réduction de la chromatine a lieu, suivant l'opi-

nion généralement admise, à l'époque précédant la formation des spores. Ainsi qu'il résulte de ce qui fut dit, cette réduction ne peut consister chez les Levures qu'en la réduction du nombre de chromosomes contenus dans un noyau, car le noyau du zygote, de même que les noyaux des spores en contiennent un nombre égal. Il faut admettre par conséquent qu'à l'époque de la réduction les chromosomes bivalents du noyau du zygote se transforment par division double chez *Schizosaccharomyces Pombe* et forment les chromosomes univalents des spores et des cellules végétatives, comme c'est le cas chez les Bactéries, les Myxobactéries et les Actinomycètes à l'époque de la réduction¹⁾. La dégénération des noyaux, autour desquels les spores ne se sont pas formées, rappelle la dégénération d'une partie de la chromatine pendant la réduction, et la formation des spores des Bactéries.

La germination des spores. Elle s'accompagne chez *Saccharomyces Pombe* de divisions végétatives normales.

IV. *Saccharomyces cerevisiae*.

La structure de la cellule végétative. Les cellules végétatives ovales ou rondes de *Saccharomyces cerevisiae* ont une structure cytologique analogue à celle des cellules de *Schizosaccharomyces Pombe*, mais elles sont souvent plus fortement vacuolisées. Quant aux substances de réserve, les cellules peuvent renfermer des globules lipidiques, des granules de vultine et du glycogène. Par suite de la vacuolisation de la cellule, son noyau est souvent placé à proximité de la paroi. De même que chez *Schizosaccharomyces Pombe*, le noyau prend la forme d'un quadrilatère composé de deux chromosomes (Fig. 5 a, h, o, microphot. 22), ou bien il est oval et sa chromatine forme une demi-lune avec un granule opposé (Fig. 5 g, n). Après sa division il peut aussi présenter la forme d'un corps plus grand uniformément coloré, dans lequel, pendant une différenciation prolongée, on peut distinguer les chromosomes dont le nombre est double (Fig. 5 b, i, p, microphot. 23).

Le bourgeonnement. La division du noyau cellulaire est indépendante dans une certaine mesure de la formation du bourgeonnement. On trouvera dans les remarques finales des données plus détaillées sur la conformité de ces phénomènes.

geon lui-même. Elle a lieu dans la phase où la formation du bourgeon commence à peine, ou bien, et c'est plus fréquemment le cas, quand le bourgeon a déjà atteint de fortes dimensions. La division du noyau a lieu dans la partie médiane de la cellule-mère ou à proximité du bourgeon. Elle commence par la division longitudinale des chromosomes (Fig. 5 b, i, p, microphot. 23) qui

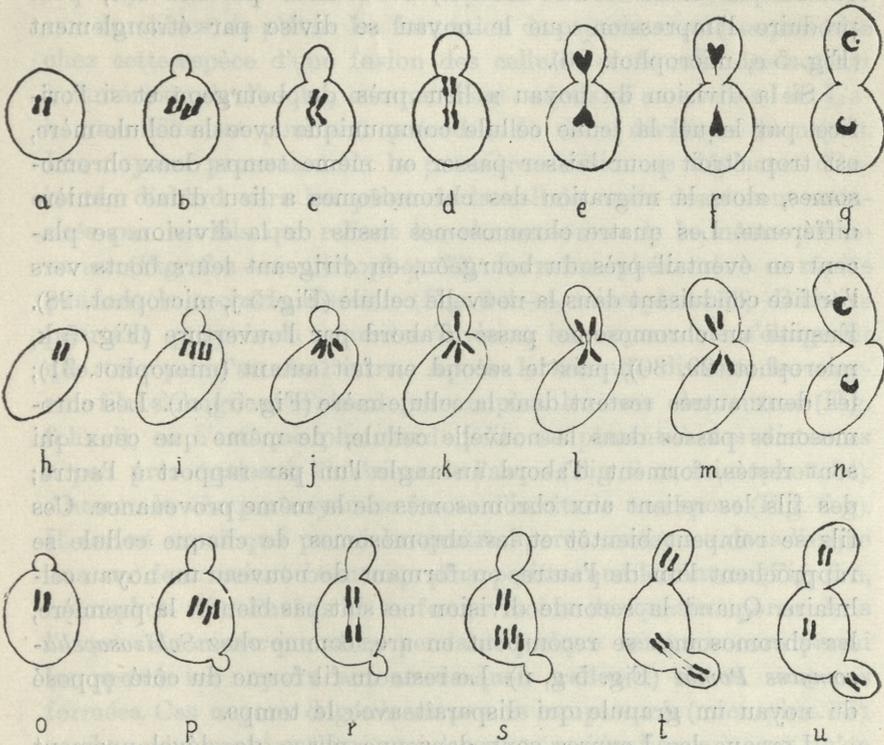


Fig. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. Bourgeonnement.

donne naissance à un noyau composé de quatre chromosomes groupés ensemble. Le déplacement des chromosomes et leur pénétration dans le bourgeon peuvent se produire de deux manières différentes. Si la division du noyau a eu lieu dans la partie médiane de la cellule et si le bourgeon communique avec la cellule-mère par une ouverture relativement grande, les chromosomes s'éloignent les uns des autres par couples, dont l'une passe dans la nouvelle cellule (Fig. 5 c—f, microphot. 24, 25, 26). Les deux

couples de chromosomes sont tout d'abord rattachées par des fils qui relient les chromosomes de la même provenance. Les chromosomes qui se dirigent du même côté ne sont souvent pas parallèles, mais se rapprochent l'un de l'autre par leurs bouts se prolongeant en fils, et présentent la silhouette d'un coeur. L'image entière des deux couples de chromosomes tournées l'une vers l'autre par leurs bouts amincis, et réunies par des fils, peut produire l'impression que le noyau se divise par étranglement (Fig. 5 e, microphot. 26).

Si la division du noyau a lieu près du bourgeon et si l'orifice, par lequel la jeune cellule communique avec la cellule-mère, est trop étroit pour laisser passer en même temps deux chromosomes, alors la migration des chromosomes a lieu d'une manière différente. Les quatre chromosomes issus de la division se placent en éventail près du bourgeon, en dirigeant leurs bouts vers l'orifice conduisant dans la nouvelle cellule (Fig. 5 j, microphot. 28). Ensuite un chromosome passe d'abord par l'ouverture (Fig. 5 k, microphot. 29, 30), puis le second en fait autant (microphot. 31); les deux autres restent dans la cellule-mère (Fig. 5 l, m). Les chromosomes passés dans la nouvelle cellule, de même que ceux qui sont restés, forment d'abord un angle l'un par rapport à l'autre; des fils les relient aux chromosomes de la même provenance. Ces fils se rompent bientôt et les chromosomes de chaque cellule se rapprochent l'un de l'autre, en formant de nouveau un noyau cellulaire. Quand la seconde division ne suit pas bientôt la première, les chromosomes se recourbent en arc, comme chez *Schizosaccharomyces Pombe* (Fig. 5 g, n). Le reste du fil forme du côté opposé du noyau un granule qui disparaît avec le temps.

Lorsque les Levures sont dans une phase de développement végétatif rapide, leurs cellules peuvent émettre en même temps deux bourgeons sur deux points différents de leur surface (Fig. 5 o—u). Le noyau de la cellule-mère se divise d'abord en deux noyaux à deux chromosomes chacun (Fig. 5 p, r). L'un d'eux se dirige vers l'un des bourgeons. En même temps les chromosomes du second noyau se divisent de nouveau et donnent ainsi naissance à une nouvelle division du noyau. On peut donc constater en ce moment dans la cellule la présence de deux noyaux de grandeur différente, l'un plus petit, composé de deux chromosomes, l'autre plus grand, se préparant à la division et contenant quatre chro-

mosomes (Fig. 5 s). Cette division une fois effectuée, l'un des noyaux-fils se dirigera vers le deuxième bourgeon et le second restera dans la cellule-mère (Fig. 5 t). Ainsi chacune des trois cellules obtiendra enfin un noyau composé de deux chromosomes (Fig. 5 u).

La réduction de la chromatine et la formation des spores. On a obtenu des spores de *Saccharomyces cerevisiae* sur des blocs de plâtre. La formation des spores n'est pas précédée chez cette espèce d'une fusion des cellules ni de celle des noyaux à l'intérieur de l'asque, comme l'ont admis Janssens et Leblanc. Elle est pourtant précédée de deux divisions du noyau. Les noyaux provenant de la première division se déplacent d'habitude d'abord vers les pôles de la cellule, mais demeurent rattachés par les fils qui relient les chromosomes de la même provenance (Fig. 6 a—c, microphot. 32). Le même phénomène se répète pendant la seconde division (Fig. 6 d—e, microphot. 33). Il arrive pourtant qu'après la première division les noyaux ne s'éloignent que très peu l'un de l'autre. Après la seconde division les noyaux-fils s'éloignent d'abord par couples les uns des autres (Fig. 6 h—l); ce n'est que plus tard qu'ils se placent à des distances à peu près égales à l'intérieur de l'asque (Fig. 6 m, microphot. 34). Autour de chaque noyau se forme d'habitude une spore (Fig. 6 g). Il arrive aussi que parmi les quatre spores contenues dans l'asque une ou deux soient beaucoup plus petites que les autres (Fig. 6 n, microphot. 36). Parfois il se forme moins de quatre spores dans l'asque. On remarque alors pendant quelque temps encore parmi les spores les noyaux autour desquels celles-ci ne se sont pas formées. Ces noyaux dégèrent peu de temps après (microphot. 37).

Les phénomènes décrits ci-dessus sont identiques à ceux qu'on observe au cours de la formation des spores chez *Schizosaccharomyces Pombe*; aussi peut-on les considérer pour la même raison comme une réduction de la chromatine consistant en une transformation des chromosomes bivalents du noyau de l'asque en chromosomes univalents des spores. La dégénération des noyaux non utilisés pendant la formation des spores correspondrait ici aussi à la dégénération d'une partie de la chromatine pendant la formation des spores chez les Bactéries. — Si la formation des spores chez *Saccharomyces cerevisiae* est vraiment accompagnée d'une réduction de la chromatine, le phénomène de la fécondation doit

donc se produire également au cours du développement de cet organisme.

La germination des spores et l'isogamie. Les spores du *Saccharomyces cerevisiae* cultivées sur gélose augmentent de volume jusqu'à ce qu'elles se touchent et remplissent entièrement l'asque. Ensuite elles commencent à fusionner deux par deux de la façon que Guilliermond a décrite chez *Saccharomyces Ludwiggii*, chez la *Levure de Johannisberg*, chez plusieurs autres

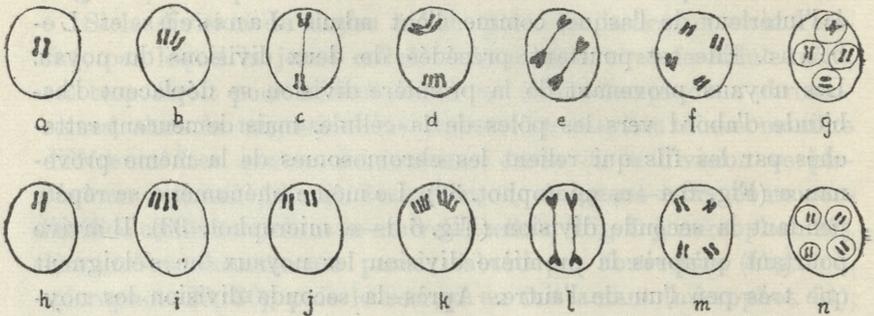


Fig. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. Formation des spores.

Levures, enfin chez *Saccharomyces paradoxus* (1936). Le canal de communication se forme d'habitude à proximité de la paroi de l'asque (Fig. 7 b), plus rarement au milieu de la surface de contact des spores (microphot. 43). Parfois on voit fusionner des spores formées dans des asques différents. Ces phénomènes sont plus nets lorsqu'on fait germer le matériel trouvé sur de vieux blocs de plâtre, qui contient des spores déjà libérées de l'asque par suite du dépérissement de la membrane. Avant la fusion les spores atteignent de plus grandes dimensions, leur volume égale celui des cellules végétatives, et le canal de communication devient plus long et plus large (Fig. 7 i, microphot. 38, 39, 40). Après la fusion des cellules le zygote commence bientôt à bourgeonner et inaugure ainsi le développement végétatif (Fig. 7 c—g, j—n, r—u, microphot. 38, 40, 44—47). Il arrive parfois que les spores commencent à germer sans avoir préalablement fusionné (microphot. 42). Il faut admettre que, comme l'ont observé Kruis et Satava (1918), Satava (1918), Winge (1935) et Guilliermond (1936), leurs cellules-filles fusionnent dans ces cas-là.

Les phénomènes cytologiques accompagnant l'isogamie sont tout à fait pareils à ceux que nous avons décrits chez *Schizosaccharomyces Pombe*. Les deux noyaux fusionnent à l'intérieur d'une des cellules ou bien, ce qu'on observe plus fréquemment,

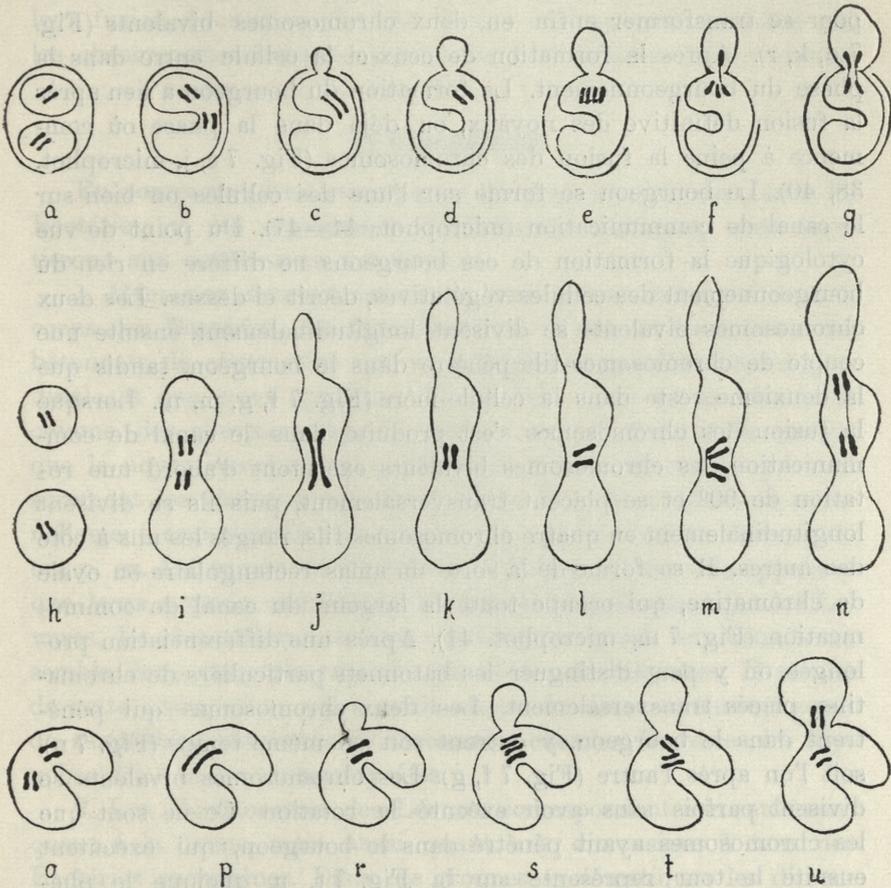


Fig. 7. *Saccharomyces cerevisiae*. Fécondation.

dans le canal de communication qui les relie. Les chromosomes des noyaux qui se rapprochent sont tournés par leurs bouts les uns vers les autres (Fig. 7 b, i, o). Au moment de la fusion des noyaux les chromosomes fusionnent deux par deux et forment deux longs fils de chromatine. Ces fils sont d'habitude parallèles (Fig. 7 c, j, p, microphot. 40), parfois, mais très rarement, ils s'entre-

croisent (microphot. 38). Les fils étant très rapprochés, ils semblent souvent n'en former qu'un seul, surtout lorsqu'on les regarde de profil (microphot. 39); néanmoins, si la différenciation est suffisante, on distingue la fente qui les sépare.

Les deux fils se raccourcissent et grossissent dans la suite pour se transformer enfin en deux chromosomes bivalents (Fig. 7 d, k, r). Après la formation de ceux-ci la cellule entre dans la phase du bourgeonnement. La formation du bourgeon a lieu après la fusion définitive des noyaux, ou déjà dans la phase où commence à peine la fusion des chromosomes (Fig. 7 c, j, microphot. 38, 40). Le bourgeon se forme sur l'une des cellules ou bien sur le canal de communication (microphot. 44—47). Du point de vue cytologique la formation de ces bourgeons ne diffère en rien du bourgeonnement des cellules végétatives, décrit ci-dessus. Les deux chromosomes bivalents se divisent longitudinalement, ensuite une couple de chromosomes-fils pénètre dans le bourgeon, tandis que la deuxième reste dans la cellule-mère (Fig. 7 f, g, m, n). Lorsque la fusion des chromosomes s'est produite dans le canal de communication, les chromosomes bivalents exécutent d'abord une rotation de 90° et se placent transversalement, puis ils se divisent longitudinalement en quatre chromosomes-fils, rangés les uns à côté des autres. Il se forme de la sorte un amas rectangulaire ou ovale de chromatine, qui occupe toute la largeur du canal de communication (Fig. 7 m, microphot. 41). Après une différenciation prolongée on y peut distinguer les bâtonnets particuliers de chromatine, placés transversalement. Les deux chromosomes qui pénètrent dans le bourgeon, y entrent soit en même temps (Fig. 7 n), soit l'un après l'autre (Fig. 7 f, g). Les chromosomes bivalents se divisent parfois sans avoir exécuté la rotation. Ce ne sont que les chromosomes ayant pénétré dans le bourgeon, qui exécutent ensuite le tour représenté sur la Fig. 7 t, u, quoique le phénomène ne s'observe que rarement. Comme une couple de chromosomes est demeurée dans la cellule-mère, le phénomène du bourgeonnement peut se répéter plusieurs fois.

Il résulte de ce que nous avons déjà dit, qu'étant précédées d'isogamie et contenant des chromosomes bivalents, les cellules végétatives de *Saccharomyces cerevisiae* forment la diplophase dans le développement de ce microorganisme. Ainsi est confirmée la supposition énoncée ci-dessus, que la réduction de la

chromatine a lieu pendant les divisions précédant la formation des spores et qu'elle se produit par la transformation des chromosomes bivalents en chromosomes univalents des spores. La circonstance que les spores haploïdales contiennent le même nombre de chromosomes que les cellules végétatives diploïdales, formées par leur fusion, fournit encore une preuve à l'appui de la thèse que les chromosomes fusionnent deux par deux pendant la fécondation.

V. Conclusions.

En comparant les Levures avec d'autres champignons, avec les Bactéries et les organismes de structure analogue, nous aboutissons aux conclusions suivantes:

1. Dans nos travaux antérieurs nous avons distingué dans le corps des Bactéries, des Myxobactéries et des Actinomycètes des bâtonnets de chromatine qui se multiplient par division longitudinale et que, nous appuyant sur ce fait, nous avons considérés comme des chromosomes. Le présent travail fournit la preuve que le noyau des Levures contient les mêmes bâtonnets qui sont sûrement les chromosomes des Levures. Des observations occasionnellement enregistrées en étudiant les spores d'autres Ascomycètes p. ex. les spores de *Penicilium* et d'*Aspergillus*, nous apprirent que leurs noyaux contiennent les mêmes chromosomes que les Levures. Le chromosome en forme de bâtonnet grossi aux deux bouts semble donc être très répandu parmi les Ascomycètes. Il résulte de cette observation qu'on avait raison de nommer chromosomes de semblables bâtonnets de chromatine chez les Bactéries, les Myxobactéries et les Actinomycètes.

2. Les chromosomes des Levures correspondent non seulement quant à la forme, mais aussi quant aux dimensions à ceux des Bactéries sporogènes. Dans ces groupes systématiques les dimensions du chromosome ne dépendent donc pas directement des dimensions de la cellule. Le parallèle suivant le démontre clairement: chez *Bacillus subtilis* les chromosomes placés transversalement occupent toute la largeur de cellules; chez la bactérie *Bacillus megatherium*, dont les cellules sont plus larges que celles de *B. subtilis*, les chromosomes ne sont pas plus grands que ceux de la bactérie mentionnée et n'atteignent donc pas les parois latérales; chez les levures dont les cellules sont de beaucoup plus gran-

des, les chromosomes ont les mêmes dimensions, mais ils se présentent en nombre deux fois plus grand que chez les Bactéries.

3. Parmi les organismes étudiés les Bactéries contiennent en principe un seul chromosome, de même que les Actinomycètes, si l'on en juge d'après le nombre de chromosomes dans les spores. Parmi les Myxobactéries les unes, comme *Myxococcus virescens*, contiennent un seul chromosome, mais *Polyangium fuscum* en renferme deux; ceux-ci ne forment pourtant pas de noyau cellulaire, mais se trouvent d'habitude dans la cellule, assez éloignés les uns des autres. Ce n'est que dans la phase de la division cellulaire que ces chromosomes se rapprochent l'un de l'autre et se placent tout près sur le plan équatorial de la cellule, puis ils se divisent. Chez les Levures les deux chromosomes sont toujours placés l'un près de l'autre et forment, entre deux divisions consécutives, un noyau rond avec un amas de chromatine en forme de demi-lune, le même qu'a remarqué M^{me} Rochlin dans ses préparations. La structure primitive du noyau des Levures est donc une forme de transition entre la structure des organismes dépourvus de noyau, contenant seulement des chromosomes placés librement dans le plasme, et ceux qui renferment des noyaux d'une structure compliquée. La présence du nucléole n'a pas été constatée chez les Levures. On peut supposer cependant que les corps décrits comme nucléoles par d'autres auteurs qui se servaient de préparations colorées à l'hématoxyline, correspondent dans certains cas à une couple de chromosomes placés à proximité immédiate et qu'on ne distingue pas l'un de l'autre à cause de leur différenciation insuffisante.

4. La structure primitive du noyau, constatée chez les Levures, n'est pas exclusivement limitée à ce groupe systématique. Les observations sur d'autres Ascomycètes, mentionnés ci-dessus, ont prouvé que les noyaux de ces organismes se composent également de deux chromosomes. Il faut encore rappeler que les noyaux des Basidiomycètes ne contiennent pour la plupart que deux chromosomes. Malgré leurs affinités avec la structure des organismes inférieurs, les Levures ne s'écartent pas des autres champignons au point de vue cytologique et présentent une organisation semblable.

5. La division de la cellule chez *Schizosaccharomyces Pombe* rappelle au point de vue morphologique la division des Bactéries

(formation de la cloison transversale), ainsi que le bourgeonnement des levures (croissance localisée de la cellule). Le mode de division du noyau cellulaire, surtout le déplacement des chromosomes-fils deux par deux et la présence de fils reliant les chromosomes de la même provenance, rappelle parmi les organismes inférieurs surtout la myxobactérie *Polyangium fuscum*, et correspond tout à fait d'autre part à la division nucléaire telle que l'a décrite p. ex. Maire chez *Lycoperdon piriforme*. La ressemblance de ces images est frappante. Elle s'explique par le fait que tous ces organismes contiennent un nombre égal de chromosomes dont les formes se ressemblent.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces Ludwigii* et la levure dite »rose«, la division nucléaire est pareille. L'apparition des fils reliant les chromosomes de la même provenance, puis l'arrangement des chromosomes en forme de coeur dans la phase du déplacement chez les espèces mentionnées en dernier lieu, nous permettent de comprendre pourquoi on a admis que les noyaux des Levures se divisent par étranglement. La division longitudinale des chromosomes, qui constitue le trait caractéristique le plus essentiel de la mitose, est pourtant une preuve que la division du noyau des Levures ne saurait être considérée comme une amitose, mais bien comme une forme primitive de caryocinèse.

La modification de la division, observée en outre chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez la levure dite »rose«, qui consiste en la pénétration l'un après l'autre des chromosomes particuliers dans le bourgeon, est une conséquence de l'étroitesse du passage entre les cellules.

6. Par la fusion des chromosomes, qui donne naissance à des chromosomes bivalents, le processus de la fécondation chez *Schizosaccharomyces Pombe* rappelle de très près la fécondation chez les Bactéries et les organismes d'une structure analogue; par le nombre égal de chromosomes la fusion des noyaux chez les Levures se rapproche surtout de la fécondation chez la myxobactérie *Polyangium fuscum*. L'adelphogamie souvent constatée chez *Schizosaccharomyces Pombe* est une étape de transition entre l'autogamie des Bactéries et l'isogamie des Levures.

7. La réduction de la chromatine et la formation des spores chez les Levures rappellent des phénomènes analogues chez les Bactéries, à la différence près, qu'au lieu de chromosomes particuliers chez celles-ci, on trouve chez les Levures des noyaux com-

posés de deux chromosomes. Dans l'un et l'autre cas la réduction de la chromatine précède immédiatement la sporulation; ici et là elle consiste en la double division des chromosomes bivalents et en leur transformation en chromosomes univalents. Tandis que sur quatre chromosomes, produits pendant la réduction chez les Bactéries, un seul sert à former la spore et que les trois autres dégèrent, tous les quatre noyaux contenus dans l'asque sont d'habitude utilisés chez les Levures. L'existence d'asques contenant à côté de spores normales des spores naines, et la présence d'asques qui renferment outre les spores des noyaux en voie de dégénérescence inutilisés pendant la sporulation, nous apprend que le phénomène de la dégénération d'une partie de la chromatine pendant la réduction, comme on l'observe chez les Bactéries, se rencontre également chez les Levures, quoiqu'il ne soit pas constant.

Le mécanisme des divisions accompagnant la réduction de la chromatine, en particulier la façon dont s'éloignent les noyaux-fils, est le même que celui des divisions végétatives. Ces divisions, tout comme les autres, sont une forme primitive de caryocinèse.

8. La succession de l'haplophase et de la diplophase chez *Schizosaccharomyces Pombe* et chez *Saccharomyces cerevisiae* se distingue par une différence caractéristique. En effet, chez *Schizosaccharomyces Pombe*, de même que chez les Bactéries, la fécondation précède immédiatement la réduction de la chromatine et la formation des spores. La diplophase y est donc de courte durée, l'haplophase embrasse au contraire les spores et toutes les cellules végétatives. Chez *Saccharomyces cerevisiae* la fécondation suit la réduction à l'époque de la germination des spores. La diplophase dure donc longtemps chez cet organisme et comprend tout le développement végétatif; seules les spores et, le cas échéant, les cellules qui s'en développent par bourgeonnement antérieur à leur fusion sont haploïdales jusqu'à l'isogamie. Mais puisqu'au moment de la fécondation les chromosomes des deux noyaux fusionnent deux par deux, les cellules végétatives haploïdales de *Schizosaccharomyces Pombe* ainsi que les cellules végétatives diploïdales de *Saccharomyces cerevisiae* contiennent un nombre égal de chromosomes. Dans le premier cas ce sont pourtant des chromosomes univalents, et dans le deuxième des bivalents.

9. Il résulte de l'ensemble de ces investigations que, nonobstant les différences qui les séparent, les Bactéries accusent au

point de vue cytologique de fortes ressemblances avec les Levures. Celles-ci s'étendent à la forme, aux dimensions des chromosomes, au mode de division, de fécondation et de réduction de la chromatine. En particulier *Schizosaccharomyces Pombe* se rapproche des Bactéries par une structure morphologique analogue et par une succession semblable de l'haplophase et de la diplophase. Nous ne voulons pas trancher la question de savoir si, en dehors des ressemblances cytologiques, il existe également des rapports phylogénétiques entre les Bactéries et les Levures. A. Meyer admettait, comme on sait, qu'il faut ranger les Bactéries parmi les Ascomycètes, vu l'analogie que présente la formation des spores. Quoiqu'il en soit, les Myxobactéries, les Bactéries et les Actinomycètes ne constituent pas, comme on voit, un groupe systématique dont la structure cellulaire est complètement différente, et qu'on ne peut rattacher à d'autres organismes, car ils sont reliés au reste du règne végétal par des ressemblances fondamentales, intéressant la structure et le développement.

10. La fusion des chromosomes univalents en bivalents pendant la fécondation chez les Levures permet d'admettre que ce phénomène (découvert la première fois chez les Myxobactéries) se produit également chez les autres champignons, qu'il s'agit donc d'un phénomène très répandu dans le monde végétal.

Cet travail a été exécuté à l'Institut de Biologie et de Botanique de l'Université de Jean Casimir à Lwów (Pologne). Je m'empresse donc d'adresser l'expression de ma profonde reconnaissance au Chef de l'Institut, M. le Prof. Dr. S. Krzemieński, qui a suivi avec beaucoup de bienveillance les progrès de ces recherches ainsi que ceux de tous mes travaux antérieurs, et n'a cessé de me prodiguer ses précieux conseils et indications. Je remercie également M. le Prof. Dr. K. Piech (Cracovie) de m'avoir fourni de précieux renseignements concernant la bibliographie du sujet.

Résumé.

1. Le noyau des Levures se compose de deux chromosomes. Dans le noyau de repos ces chromosomes sont recourbés en forme d'arc et entourent une partie incolore. On n'a pas constaté la présence d'un nucléole.

2. La division du noyau se fait par une forme primitive de mitose. Elle consiste en la division longitudinale des chromosomes qui dans la suite s'éloignent par couples les uns des autres. Les chromosomes de la même provenance sont rattachés par un mince fil de chromatine qui se rompt après.

3. Pendant la fécondation les chromosomes des deux noyaux fusionnent deux par deux et forment ainsi chez les Levures des chromosomes bivalents. Le noyau du zygote contient donc le même nombre de chromosomes que celui de la cellule haploïdale.

4. Avant la formation des spores a lieu chez les Levures la réduction de la chromatine. Les chromosomes bivalents subissent alors une double division et deviennent ainsi univalents. S'il se forme dans un asque moins de quatre spores, les noyaux inutilisés pendant la sporulation dégénèrent.

5. Les spores et les cellules végétatives de *Schizosaccharomyces Pombe*, où la fécondation précède la sporulation, sont haploïdales et contiennent des chromosomes univalents. Chez *Saccharomyces cerevisiae* la fécondation a lieu pendant la germination des spores, les cellules végétatives sont donc diploïdales et contiennent des chromosomes bivalents.

6. La forme et les dimensions des chromosomes, le mode de division nucléaire et de la fécondation, et le mode de réduction de la chromatine témoignent d'une forte affinité cytologique entre les levures d'une part et les Bactéries, les Myxobactéries et les Actinomycètes de l'autre. Quoique dépourvus de noyaux cellulaires, ces microorganismes sont par conséquent rapprochés des champignons au point de vue cytologique.

Institut de Biologie et de Botanique de l'Université de Jean Casimir à Lwów (Pologne).

Explication des microphotographies sur la planche 5.

Dans les observations au microscope on se sert d'objectifs Zeiss Apochom. 1.5 (120 \times) et Fl 1/12 (100 \times) ainsi que d'oculaires 10 \times et 15 \times .

Les microphotographies furent exécutées à l'aide de l'objectif de Zeiss Apochrom. 120 et de l'oculaire Zeiss 5 \times . On a obtenu sur les clichés un grossissement de 500 \times . On a fait ensuite des copies en grossissant les clichés de 3 \times et 4 \times , et on réalisa ainsi un grossissement de 1500 \times et 2000 \times . Vu les grandes difficultés, auxquelles se heurte la photographie des préparations cytologiques des Levures, les microphotographies ci-jointes ne repro-

duisent pas toujours tous les détails décrits dans le texte. Elles forment pourtant, à notre avis, un document qui suffit à prouver la réalité des structures que nous avons décrites.

1-7. *Schizosaccharomyces Pombe*: Développement végétatif.

1. Cellules végétatives: La chromatine des noyaux en forme de demilune, v. Fig. 1 a. — 2000X.

2. Division du noyau. Deux couples de chromosomes rattachés par des fils de chromatine, v. Fig. 2 d. — 2000X.

3. Division du noyau. Un des deux fils de chromatine est déjà rompu, v. Fig. 2 e. — 2000X.

4. Division du noyau. Deux couples de chromosomes; les deux fils de chromatine sont déjà rompus; granules de volutine, v. Fig. 2 f. — 2000X.

5 et 6. Cellules dans la phase de division. Dans chaque cellule deux couples de chromosomes en forme de courts bâtonnets, v. Fig. 2 f. — 2000X.

7. Division de la cellule. Chaque cellule-fille contient une couple de chromosomes, v. Fig. 2 g. — 2000X.

8. *Saccharomyces Ludwigi*. Cellule végétative; noyau composé de deux chromosomes et granules de volutine. — 2000X.

9-21. *Schizosaccharomyces Pombe*. Fécondation et formation des spores.

9. En bas — cellule végétative avec noyau de repos, v. Fig. 1 a.

En haut — cellule formée par la fusion de deux cellules-soeurs (adelphogamie). Au milieu de la cellule deux fils parallèles de chromatine, formés par la fusion de deux couples de chromosomes, v. Fig. 3 l. — 2000X.

10. Isogamie. La chromatine en forme d'un long fil. La fissure longitudinale, — comme on le remarque sur la microphot. 9 — n'est pas visible, v. Fig. 3 e. — 1500X.

11. Isogamie. Deux chromosomes bivalents, plus grands que les chromosomes des cellules végétatives, v. Fig. 3 f. — 2000X.

12 et 13. Asque avec un noyau se préparant à la première division. Les 4 chromosomes sont placés transversalement l'un près de l'autre, v. Fig. 4 i. — 1500X.

14 et 15. Formation des spores; première division du noyau de l'asque. Les noyaux-fils sont rattachés par un fil de chromatine, v. Fig. 4 b. — 1500X.

16. Asque contenant 4 noyaux.

17. Asque contenant 3 spores de dimensions normales et une spore beaucoup plus petite. — 1500X.

18. Asque contenant 2 spores de dimensions normales et 2 spores plus petites. — 1500X.

19 et 20. Asques contenant deux spores de dimensions normales, une spore plus petite et un noyau en voie de dégénération. — 1500X.

21. Asque formé par autogamie, contenant 4 spores, v. microphot. 9. — 1500X.

22-31. *Saccharomyces cerevisiae*. Développement végétatif.

22. Cellule végétative; noyau composé de deux chromosomes, v. Fig. 5 a. — 2000X.

23. Cellule végétative avant le bourgeonnement; noyau composé de quatre chromosomes, dont un nettement visible, les autres groupés ensemble, v. Fig. 5 b, i. — 2000X.

24 et 25. Division du noyau; deux couples de chromosomes rattachés par des fils de chromatine, v. Fig. 5 d. — 2000X.

26. Bourgeonnement de la cellule; noyaux-fils en forme de coeur, rattachés par un fil, v. Fig. 5 e. — 2000X.

27. Voir n° 23; tous les chromosomes groupés ensemble, v. Fig. 5 i. — 2000X.

28—30. Chromosomes groupés à la base du bourgeon; un chromosome pénètre dans le bourgeon, v. Fig. 5 j, k. — 2000X.

31. Bourgeonnement de la cellule; deux chromosomes ont pénétré du noyau de la cellule inférieure dans la supérieure, v. Fig. 5 m. — 2000X.

32—37. *Saccharomyces cerevisiae*. Formation des spores.

32. Asque; première division du noyau; chaque noyau-fils composé de deux chromosomes, v. Fig. 6 c. — 2000X.

33. Asque; deuxième division des noyaux; quatre noyaux rattachés deux par deux, v. Fig. 6 e. — 2000X.

34. Asque contenant quatre noyaux, v. Fig. 6 f. — 2000X.

35. Asque contenant quatre spores. — 1500X.

36. Asque contenant 3 spores de dimensions normales et une spore beaucoup plus petite. — 1500X.

37. Asque contenant deux spores et un noyau en voie de dégénération. — 1500X.

38—41. *Saccharomyces cerevisiae*. Fécondation.

38. Isogamie; bourgeon sur le canal de communication. Chromosomes de deux noyaux fusionnés en deux fils de chromatine croisés, v. Fig. 7 p, r. — 1500X.

39. Isogamie; la chromatine en forme d'un long fil. La fissure longitudinale n'est pas visible, v. Fig. 7 j et microphot. 10. — 2000X.

40. Isogamie; bourgeon au bout d'une cellule; la chromatine en deux fils parallèles, fissure longitudinale visible aux deux bouts, v. Fig. 7 j. — 2000X.

41. Zygote avant le bourgeonnement; amas de chromatine composé de quatre chromosomes situés transversalement, v. Fig. 7 e, m. — 2000X.

42—47. *Saccharomyces cerevisiae*. Germination des spores.

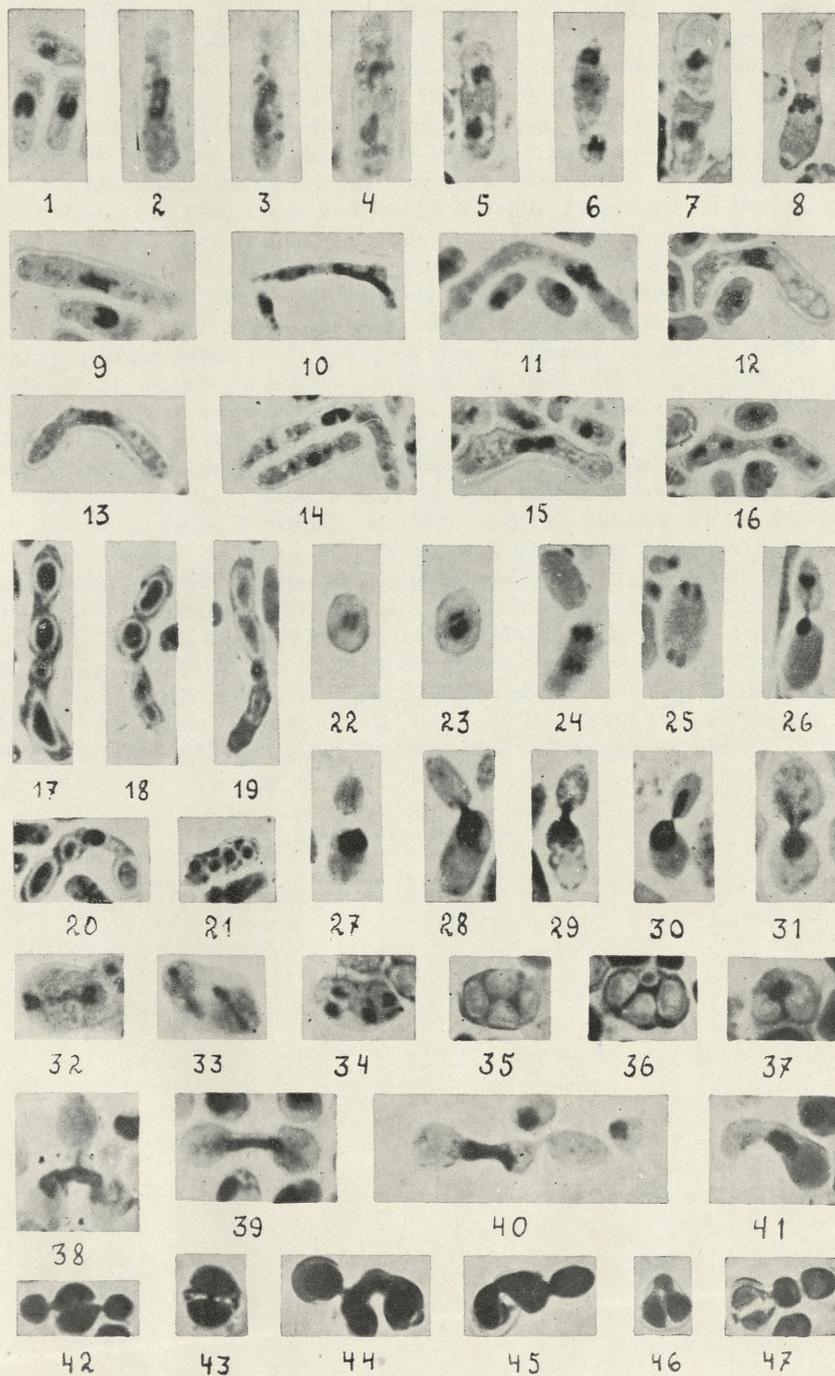
42. Spores bourgeonnant sans s'être fusionnées.

43—47. Différentes formes de fusion des spores et de bourgeonnement des zygotes.

Bibliographie.

Des index bibliographiques détaillés de travaux se rapportant à la cytologie des Levures se trouvent dans les oeuvres marquées d'un astérisque. Nous nous bornons à citer les travaux mentionnés dans le texte.

1. Badian. Acta Soc. Bot. Poloniae VII. 1930, ibid. X. 1933, ibid. XIII. 1936. Archiv f. Microbiol. 4. 1933. Kosmos B. LX. 1935. — 2. Bouin. Arch.



J. Badian.

- d'anat. microscop. 1. 1897. — 3. Buscalioni. Malpighia X. 1896. — 4. Buscalioni et Casagrandi. Malpighia XII. 1898. — 5. Casagrandi. Centr. f. Bakt. II. 3. 1897. — 6. Dangeard. C. R. de l'Acad. d. Sc. Paris 117. 1893. — 7. Feinberg. Ber. d. D. Bot. Ges. 20. 1902. — 8. Fuhrmann. Centr. f. Bakt. II. 15. 1906. — 9. Guilliermond. C. R. Acad. Sc. Paris 133. 1901, *ibid.* 147. 1908, *ibid.* 148. 1909, **ibid.* 201, 1935. Recherches cytol. sur les levures. Paris 1902; Rev. génér. de Bot. 15. 1903, *ibid.* 17. 1905, **ibid.* 48. 1936; Annal. mycol. 2. 1904. *ibid.* 8. 1910; Bull. de l'Inst. Pasteur 3. 1905; Centr. f. Bakt. II. 26. 1910; Progressus rei Bot. 40. 1913; Ann. de l'Inst. Pasteur 31. 1917: C. R. Soc. Biol. 82. 1919, *ibid.* 88. 1923. — 10. Guilliermond, Mangenot, Plantefol. Traité de cytologie végétale, Paris 1933. — 11. Hennenberg. Centr. f. Bakt. II. 35. 1912, *ibid.* 44. 1916. — 12. Hirschbruch. Centr. f. Bakt. 9. 1902. — 13. Hoffmeister. Sitzungsber. d. D. nat.-med. Ver. f. Böhmen »Lotos« N. F. 20. 1900. — 14. Janssens. Centr. f. Bakt. 13. 1893; Cellule 20. 1903. — 15. Janssens et Leblanc. Cellule 14. 1898. — 16. Kater. Biol. Bull. Marine Laborat. Woods Hole Mass. 52. 1928. — 17. Kohl. Ber. d. D. Bot. Ges. 25. 1907; Die Hefepilze, Leipzig 1908. — 18. Marpman. Centr. f. Bakt. 9. 1902. — 19. Möller. Centr. f. Bakt. 12. 1893; Ber. d. D. Bot. Ges. 1893. — 20. Rochlin. Centr. f. Bakt. II. 88. 1933. — 21. Swellengrebel. Ann. de l'Inst. Pasteur 19. 1905. — 22. *Tischler. Allgemeine Pflanzenkaryologie, Berlin 1921—22; Allgemeine Pflanzenkaryologie II. Auf. I. Hälfte, Berlin 1934. — 23. Wager. Ann. of Bot. 12. 1898; The yeast cell. 1911 (v. Ref. Centr. f. Bakt. II. 32). — *Wager et Peniston. Ann. of Bot. 1900. — 25. Wingard. Paper Nr. 65 from the Depart. of Plant. Pathol. Virginia Agricult. Stat. 1925. — 26. Winge. C. R. du Laborat. Carlsberg 21. 1935. — 27. *Zikes. Centr. f. Bakt. II. 31. 1912. — 28. Zettnow. Zeitschr. f. Hyg. 30. 1899. — 29. Ziemann. Deutsche Med. Wochenschrift 1898.

*Badania nad pobieraniem antymerów optycznych kwasu winowego przez kropidlaka *Aspergillus fumigatus* Fres. Recherches sur l'utilisation des antipodes optiques de l'acide racémique par *Aspergillus fumigatus* Fres.*

Mémoire

de M. F. GORSKI,

présenté le 10 mai 1937, par MM. S. Krzemieniewski m. c. et L. Marchlewski m. t.

1. Nous savons depuis les études de Pasteur (1857, 58) que *Penicillium* cultivé sur une solution nutritive additionnée d'acide racémique utilise principalement l'acide droit. Pfeffer (1895) étendit ces recherches en cultivant sur de l'acide racémique 14 différents organismes dont plusieurs consommaient également de préférence l'acide droit. Les variations considérables du taux de l'utilisation de l'acide gauche, notées par cet auteur suggèrent l'idée que les conditions extérieures exercent une grande influence sur ce phénomène. La marche de la consommation des antipodes de l'acide racémique par *Aspergillus niger* à mesure du temps écoulé a été étudiée par Ulpiani et Condelli (1900); après plusieurs semaines la solution nutritive ne contenait que des traces de l'inverse droit et 65 p. c. de l'inverse gauche. Plusieurs chimistes (Lewkowitsch 1883, Schulze et Bosshard 1893, Fischer E. 1900, Pringsheim 1910 et d'autres) eurent recours à différentes espèces de moisissures pour isoler les antipodes optiques. L'efficacité de la méthode biologique appliquée pour séparer les antipodes a fait l'objet des recherches de Mac Kenzie et Harden (1903) qui étudièrent l'utilisation de nombreux acides racémiques par trois espèces d'aspergilles. Ils conclurent que la méthode en question ne permet pas d'isoler les inverses optiques à l'état pur. Ces travaux exécutés par des chimistes en vue de

recherches chimiques ne contribuèrent cependant pas à étendre nos connaissances plutôt restreintes des conditions de l'utilisation des combinaisons racémiques par des organismes hétérotrophes. Nous avons cherché à combler du moins en partie cette lacune en faisant de recherches détaillées sur l'utilisation de l'acide racémique par une aspergille. Nos investigations préliminaires établirent que *Aspergillus niger* et deux moisissures du genre *Penicillium* consomment assez facilement l'acide gauche. Par contre, nous avons trouvé chez *Aspergillus fumigatus* Fres. un champignon utilisant presque exclusivement l'acide droit. Nous avons étudié l'influence de divers agents tels que la température, la concentration de l'acide, l'addition de sels de différents métaux etc. sur l'utilisation des inverses optiques de l'acide racémique par cette aspergille. Nous nous sommes également occupé de l'assimilation de l'acide malique et de l'acide tartrique inactif.

2. Méthode. La méthode de Holleman (1898) servait à obtenir l'acide racémique en partant de l'acide tartrique du commerce. Pour isoler l'acide gauche on employait ou la méthode biologique ou la méthode de Gernez (1866) qui consiste à inoculer une solution sursaturée de racémate de sodium et d'ammonium avec des traces du sel gauche. L'aspergille était cultivée dans des fioles de 50 cmc. gardées à l'obscurité et à la température de 30° C. Le tableau I indique la composition des trois types de solutions nutritives employées. La première contient de l'acide racémique libre additionné d'ammoniaque dont la quantité suffit à neutraliser 1/6 de la quantité de l'acide. La réaction de la solution était plus acide

TABLEAU I.

Composition des solutions nutritives (mg.).

acide racémique	300.0	300.0	300.0
ammoniaque	11.3	34.0	—
KH ₂ PO ₄	5.0	5.0	5.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5	2.5	2.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.25	0.25	0.25
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	0.1	0.1
FeCl ₃	0.1	0.1	0.1
Na	—	—	46.0
eau distillée cmc.	25	25	25
pH	2.7	3.3	—

que dans les deux milieux nutritifs suivants, dans lesquels la source carbonnée était constituée par du racémate acide d'ammonium ou de sodium. Dans ce dernier cas l'ammoniaque était remplacé par de la gélatine, de l'asparagine etc.

Une série comprenait 20 à 40 fioles stérilisées pendant deux heures et inoculées le lendemain. Après de laps de temps déterminés on dosait les acides non consommés dans une partie des fioles. La solution séparée du mycélium à l'aide d'un filtre de Buchner s'écoulait directement dans une fiole jaugée (26 cmc.). Le mycélium était lavé avec quelques cmc. d'eau. Dans une partie du filtrat (10 cmc.) les acides étaient précipités sous forme de tartrates acides de potassium qu'on dosait ensuite en les titrant avec une solution de soude à 1/10 n. Des analyses spéciales ont établi qu'on retrouve 99 p. c. de l'acide tartrique. Une autre partie du filtrat (10 cmc.) servait au dosage polarimétrique exécuté à l'aide d'une méthode d'une haute précision, dont les détails ont été décrits ailleurs (Górski 1937). Ces données permettent de calculer les quantités d'acide droit et d'acide gauche utilisées par l'aspergille.

On dut employer des méthodes différentes pour doser l'acide malique et l'acide tartrique dans des cultures additionnées d'acide borique ou de molybdate. Nous avons employé soit la méthode de Ronchèse qui consiste à titrer la solution nutritive additionnée d'un excès de formaldéhyde avec de la soude, soit la méthode basée sur le dosage du dioxyde de carbone dégagé par l'oxydation avec de l'acide chromique.

L'oxydation spontanée de l'acide racémique a fait l'objet de recherches détaillées. Dans les fioles stérilisées les pertes produites par l'oxydation spontanée sont négligeables et ne dépassent pas 1 ou 2 p. c. après 9 ou 10 semaines, à condition toutefois de garder les fioles à l'obscurité.

3. Des recherches préliminaires établirent que *Aspergillus* se développe le mieux sur des solutions nutritives constituées par de l'acide racémique libre. Dans des milieux nutritifs contenant des sels d'ammonium acides ou neutres, la partie acide est assimilée en quantité plus grande. Par conséquent la base s'accumule dans les liqueurs et provoque une réaction alcaline qui arrête le développement du champignon. Ainsi p. ex. dans nos cultures contenant uniquement du tartrate droit d'ammonium, le taux de

l'acide disparu atteignait 59 p. c. après 10 jours. Cette valeur ne changea plus pendant les deux semaines suivantes. Environ 40 p. c. de l'acide ne furent pas utilisés par suite de la réaction alcaline (pH: 7.1), conséquence de l'accumulation de l'ammoniaque dans la solution.

TABLEAU II.

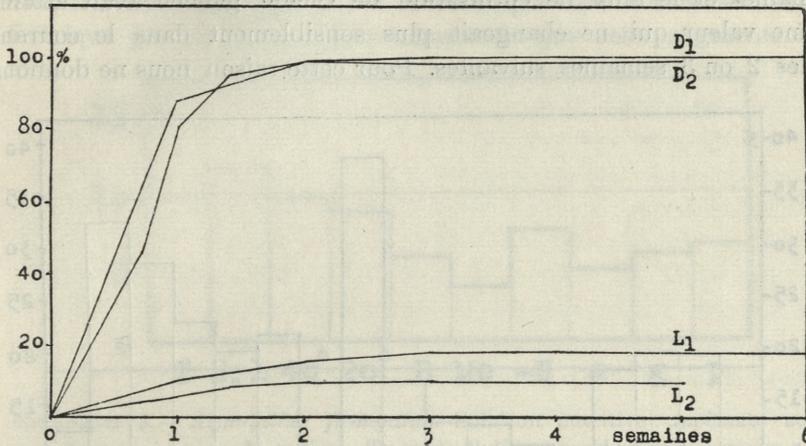
Taux de l'utilisation des inverses de l'acide racémique					
acide racémique:					
semaines:	1	2	3	5 ¹⁾	6
%l:	10.4 ± .6	15.1 ± .4	17.6 ± .3	18.0 ± .3	18.2 ± .4
%d:	87.6 ± .1	98.3 ± .4	99.2 ± .1	99.7 ± .0	99.6 ± .1
%d:%l:	8.4	6.5	5.6	5.5	5.5
pH:	3.2	3.5	3.5	3.5	3.6
racémate acide d'ammonium					
%l:	5.6 ± .5	9.3 ± .3	9.7 ± .2	9.9 ± .3	— —
%d:	80.7 ± .2	98.2 ± .2	97.7 ± .2	98.7 ± .1	— —
%d:%l:	14.4	10.6	10.1	10.0	— —
pH:	5.3	6.8	6.8	6.4	— —

Nous avons réuni dans le tableau II et le graphique 1 les résultats obtenus avec des solutions nutritives constituées par de l'acide racémique libre ou du racémate d'ammonium²⁾. L'acide droit disparaît presque complètement au cours de deux semaines. Après trois semaines il n'en reste que des traces. A la même époque le taux de l'acide gauche disparu s'élève à 9.7 p. c. dans les cultures contenant du racémate et à 18 p. c. dans les cultures constituées par de l'acide libre. Nous voyons que les valeurs nutritives des antipodes de l'acide racémique sont très différentes. On pourrait même supposer que l'acide gauche n'est pas en général utilisé par *Aspergillus fumigatus*, la perte observée étant attribuable à des processus d'oxydation qui n'ont rien à faire avec l'activité vitale du champignon. Cette hypothèse est contre-

¹⁾ 4 semaines pour l'acide racémique.

²⁾ Dans les cultures formées par du racémate d'ammonium nous avons fait des analyses le 5-ème et le 10-ème jour. Les valeurs correspondantes des taux, 4.1 ± .4 et 9.0 ± .3 pour l'inverse gauche et 45.9 ± 2.1 et 95.5 ± .6 pour l'inverse droit ne figurent pas dans le tableau II, mais ont été représentées dans le graphique 1.

dite par un fait sur lequel nous voulons attirer l'attention: le taux de l'acide gauche utilisé ne change presque plus après les 2 ou 3 semaines suivantes. On ne comprend pas bien pour quelle raison un processus d'oxydation secondaire et non vital s'arrêterait précisément au moment où, par suite de la désintégration commencée du mycélium, des agents d'oxydation pénètrent dans la solution et devraient par conséquent accélérer l'oxydation de l'acide gauche.



Graphique 1. — *Aspergillus fumigatus*. Taux de l'utilisation des inverses optiques de l'acide racémique dans des cultures constituées par de l'acide libre (1) ou du racémate acide d'ammonium (2).

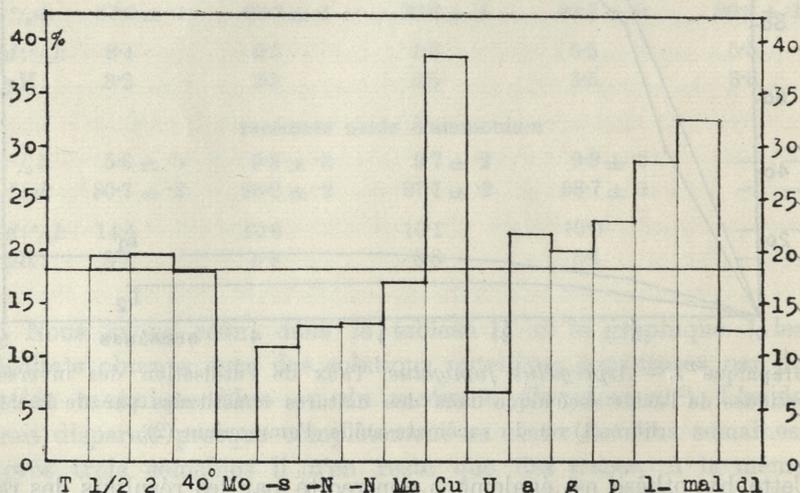
Cette hypothèse est également contredite par les résultats des recherches de plusieurs auteurs ainsi que par les nôtres où l'on s'est servi d'autres espèces d'aspergilles. On observe des taux d'utilisation de l'acide gauche qui dépassent 40 et 60 p. c. et qu'il est impossible d'attribuer à des processus d'oxydation secondaires. De ces remarques nous tirons la conclusion que *Aspergillus fumigatus* assimile effectivement l'acide gauche et que cette assimilation se fait simultanément avec celle de l'acide droit.

VI. 4. Nous avons étudié l'influence des agents suivants sur l'utilisation de l'acide gauche par notre aspergille:

- a) changements de la concentration de l'acide,
- b) changements de la température,
- c) acidité des solutions nutritives,
- d) addition d'acide borique ou de molybdate,
- e) réduction de la dose des sels minéraux et de l'azote,

- f) addition de sels de certains métaux,
- g) addition de peptone, de gélatine ou d'asparagine,
- h) addition d'acide malique.

Comme dans les expériences précédentes on suivait la marche de l'utilisation des inverses optiques en faisant des analyses à des moments déterminés (1, 2, 3, 5 ou 6 semaines). Dans la plupart des cas l'acide droit avait complètement disparu après trois semaines et le taux de l'utilisation de l'acide gauche avait atteint une valeur qui ne changeait plus sensiblement dans le courant des 2 ou 3 semaines suivantes. Pour cette raison nous ne donnons

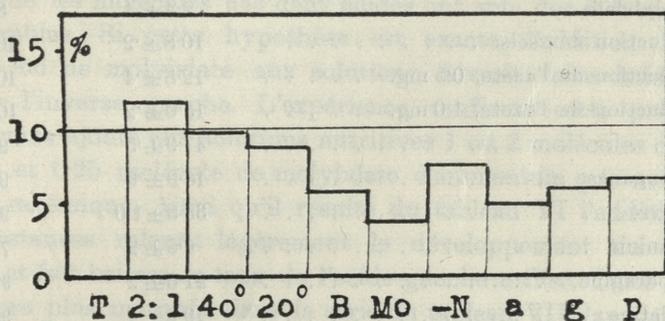


Graphique 2. — *Aspergillus fumigatus*. Solution nutritive: acide racémique libre. Action de divers agents sur le taux de l'utilisation de l'acide gauche (v. tableau III, le fer a été omis).

dans les tableaux et dans les graphiques que les données qui se rapportent à la période finale (après 5 ou 6 semaines). On trouvera dans le tableau III et le graphique 2 les résultats obtenus en cultivant l'aspergille sur de l'acide racémique libre. Le tableau IV et le graphique 3 contiennent les résultats donnés par les cultures formées de racémate acide d'ammonium ou de sodium.

a) et b) Il résulte de ces tableaux que les variations de température (20° et 40° C.) ou les variations de la concentration de l'acide (150 mg. et 600 mg. par fiole) ne produisirent aucun effet sur le phénomène étudié.

c) Nous avons fait déjà observer que le taux de l'utilisation de l'acide gauche s'élève quand on remplace le racémate d'ammonium par de l'acide racémique libre. Il est intéressant de comparer le taux de l'acide gauche disparu (9.7 et 18.2 p. c.) avec l'acidité des solutions nutritives (pH: 2.7 et 3.5) et avec les rotations spécifiques des acides tartriques ($[\alpha]_D = \pm 15^\circ$), des sels acides ($[\alpha]_D = \pm 22.8^\circ$) et des sels neutres ($[\alpha]_D = \pm 28^\circ$). La rotation spécifique augmente à mesure que l'on neutralise l'acide tartrique par une base. Nous admettons que cette augmentation



Graphique 3. — *Aspergillus fumigatus*. Solution nutritive: racémate acide d'ammonium ou de sodium. Taux de l'utilisation de l'acide gauche.

du pouvoir rotatoire est le résultat d'une déformation de la molécule de l'acide droit ou gauche. Nous supposons que ce changement rend l'assimilation de l'acide gauche plus difficile et fait baisser le taux de l'acide gauche consommé. Une objection se présente toutefois: le taux moins élevé observé avec les solutions additionnées de racémate d'ammonium peut s'expliquer par la réaction à peu près neutre du milieu nutritif dans la dernière période de l'expérience, réaction qui, comme nous venons de le voir, arrête la croissance du champignon. Nous avons écarté cette objection en cultivant l'aspergille sur un milieu nutritif qui contenait deux fois autant de tartrate gauche d'ammonium que de tartrate droit. Après deux semaines l'inverse droit avait disparu, les taux de l'utilisation de l'inverse gauche s'élevaient à 11.2 et à 11.9 p. c. après 3 et 5 semaines. La réaction du milieu nutritif était franchement acide (pH inférieur à 4), néanmoins les taux de l'acide gauche disparu s'écartent considérablement des valeurs correspondantes des cultures contenant de l'acide libre (18.2 p. c.) et

TABLEAU III et IV.

Taux de l'utilisation de l'acide tartrique droit et gauche après 5 ou 6 semaines par *Aspergillus fumigatus*

No.	agent:	acide racémique	
		gauche	droit
1.	culture témoin	18·2±·4	99·6±·1
2 ¹⁾	concentr. de l'acide 1/2	19·4±·6	99·7±·2
3 ¹⁾	concentr. de l'acide double	19·6±·6	100
4.	température 40° C.	17·9±·7	99·7±·1
5.	molybdate	2·4±·4	80·1±3·0
6.	réduction des sels.	10·8±·2	100
7.	réduction de l'azote, 0·5 mg.	12·8±·4	100
8.	réduction de l'azote, 1·0 mg.	13·0±·2	100
9.	fer	47·9±·5	98·5±·2
10.	manganèse	16·9±·6	99·8±·1
11.	cuivre	38·5±1·0	99·7±·2
12.	uranium	6·6±·2	73·0±1·3
13.	asparagine	21·6±·2	99·1±·1
14.	gélatine	19·9±·4	99·6±·2
15.	peptone	23·3±·3	100
16.	acide malique gauche	28·5±1·1	100
17 ²⁾	acide malique gauche	32·5±·5	—
18 ²⁾	acide malique inactif :	12·6±·2	—
racémate acide d'ammonium ou de sodium			
No.	agent:	acide utilisé p. c.	
		gauche	droit
1.	culture témoin	9·9±·3	98·7±·1
2 ³⁾	acide l: acide d = 2:1	11·9±·2	99·7
3.	température 40° C.	9·7±·1	99·5±·0
4.	température 20° C.	8·6±·2	99·6
5.	acide borique 1:1 et 2:1	5·5±·6	91·7±·5
6.	molybdate d'ammonium	3·5±·5	95·7
7.	réduction de l'azote, 1 mg.	7·3±·6	97·2±·6
8.	asparagine	4·8±·2	92·0±·1
9.	gélatine	5·7±·5	89·1±·1
10.	peptone	6·5±·3	85·2±·2

1) Moyennes après 4 et 6 semaines.

2) Les cultures contenaient seulement du tartrate gauche acide.

3) La solution nutritive d'une fiole contenait 200 mg. d'acide gauche et 100 mg. d'acide droit.

se rapprochent des taux observés en faisant croître l'aspergille sur du racémate (9.7 p. c.). Nous en concluons que l'inverse gauche sous la forme de sel acide est plus difficilement assimilable que l'acide libre.

d) On peut citer à l'appui de cette supposition les résultats obtenus avec des cultures additionnées d'acide borique ou de molybdate d'ammonium ou de sodium. Ces substances forment avec les acides tartriques des complexes caractérisés par une forte rotation spécifique (tabl. V), qui indique, selon notre hypothèse, que les molécules des deux acides ont subi des déformations considérables. Si cette hypothèse est exacte, l'addition d'acide borique ou de molybdate aux solutions devrait faire baisser le taux de l'inverse gauche. L'expérience confirme cette prévision. Nous avons ajouté aux solutions nutritives 1 ou 2 molécules d'acide borique et 0.25 molécule de molybdate d'ammonium par molécule d'acide racémique. Ainsi qu'il résulte du tableau VI l'addition de ces substances ralentit légèrement le développement du champignon et fait baisser le taux de l'acide gauche utilisé. Cette baisse est encore plus marquée dans la série du tableau VII dans laquelle le rapport de l'acide et du molybdate était égal à 1. La croissance très lente de l'aspergille nous obligea de prolonger la durée de l'expérience jusqu'à 15 semaines.

TABLEAU V.

Pouvoirs rotatoires spécifiques des complexes borés et molybdés.

B	B	Mo	Mo
1:1	2:1	0.25:1	1:1
115	140	640	610

TABLEAU VI.

Influence de l'addition d'acide borique ou de molybdate d'ammonium sur le taux de l'utilisation de l'acide tartrique gauche.

		Racémate acide d'ammonium.			
semaines:		1	2	3	5
H ₃ BO ₃	% l:	3.8 ± .7	3.4 ± .4	5.2 ± .2	7.0 ± .7
1:1	% d:	82.7 ± 2.1	92.0 ± .7	92.4 ± .3	91.9 ± .5
	% l:	1.5 ± .8	5.3 ± .2	5.4 ± .4	4.0 ± .3
2:1	% d:	67.7 ± 3.1	88.2 ± .1	89.0 ± .6	91.5 ± .6
moy:	% l:	2.6 ± .6	4.4 ± .4	5.3 ± .2	5.5 ± .6
	% d:	2.1 ± .2	2.8 ± .2	3.1 ± .5	3.5 ± .5
NH ₄ Mo	% d:	67.2 ± 2.6	89.9 ± .4	94.2 ± .5	95.7

TABLEAU VII.

Acide racémique + Na ₂ MoO ₄ (1:1).				
semaines:	3	5	9	15
%l:	1.4 ± .3	1.5 ± .5	1.0 ± .5	2.4 ± .4
%d:	4.2 ± .6	31.0 ± 3.0	66.0 ± 6.0	80.1 ± 3.0

e) On arrive également à baisser le taux de l'utilisation de l'acide gauche en cultivant le champignon sur des milieux nutritifs dont la dose normale des sels minéraux a été considérablement réduite. Les taux de l'utilisation de l'inverse gauche dans les cultures dans lesquelles la concentration du potassium, du magnésium, du phosphore ou du soufre a été réduite à 1/10, étaient à peine inférieurs aux taux des cultures témoins et ne figurent pas dans les tableaux. Une diminution encore plus forte de la dose normale de tous les sels minéraux (1/20) ou de l'azote (0.5 ou 1.0 mg. par fiole) fit baisser le taux de l'utilisation de l'acide gauche.

Une diminution, voire même la suppression du zinc, du fer, ou du manganèse ralentissent quelque peu le développement du champignon sans produire d'effet appréciable sur le phénomène étudié. Toutefois, il serait prématuré d'en conclure que ces éléments n'exercent aucune influence sur l'utilisation de l'inverse gauche, quand on ne perd pas de vue que des traces de ces métaux apportées avec l'eau distillée, avec les autres sels nutritifs, ou enfin les traces contenus dans le verre des fioles (Mosseray 1932/3) suffisent à assurer un développement normal de l'aspergille.

f) L'addition d'une petite quantité de calcium ou de strontium (1 mg. par fiole) ne produit aucun effet. Une partie de calcium fut précipitée par l'acide racémique.

En faisant augmenter la concentration du fer (FeSO₄.7H₂O) jusqu'à 0.01 p. c. on observe une oxydation spontanée très prononcée de l'acide racémique dans les fioles témoins qui n'ont pas été inoculées (tableau VIII). Dans les fioles inoculées le taux de l'acide gauche qui a disparu s'élève à 48 p. c. Cette valeur ne diffère cependant pas sensiblement du total (40.7) des taux des cultures à dose normale de fer (18.2 p. c.) et du taux des fioles témoins (22.5 p. c.); elle semble indiquer que le fer n'exerce pas d'action stimulante sur l'utilisation de l'acide gauche par l'aspergille. Remarquons encore que le poids sec (13 mg.) des mycéliums cultivés sur les milieux nutritifs additionnés de fer à 0.01 p. c. est

inférieur au poids sec des cultures à dose normale (15 mg.). Ce fait semble également indiquer que le taux plus élevé de l'acide gauche disparu n'est pas attribuable à son utilisation par le champignon, mais à un processus secondaire d'oxydation.

TABLEAU VIII.

Taux de l'oxydation spontanée dans les fioles témoins après 6 semaines.

Fe	Mn	Cu	U
22.5	1.0	4.5	1.4

Une augmentation de la concentration du cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2/1000 d'une molécule par litre ou 3.4 mg. de cuivre par fiole) fit également monter sensiblement le taux de l'acide gauche disparu (38.5 p. c.). Cette valeur est 2.2 plus grande que le taux normal et presque 9 fois (8.9) plus élevée que le taux des fioles témoins (4.5 p. c., tabl. VIII). Bien que ces nombres semblent indiquer que le cuivre facilite au champignon l'utilisation de l'acide gauche, nous avons plusieurs raisons de supposer que les pertes de l'inverse gauche sont attribuables à l'action stimulante du cuivre sur des agents d'oxydation qui du mycélium ont pénétré dans la solution nutritive. En premier lieu le poids sec des mycéliums est inférieur au poids des mycéliums provenant des cultures normales (14.1 et 15 mg.). En second lieu nous savons que le cuivre stimule l'action des agents d'oxydation, celle du fer particulièrement (Palit et Dhar 1934, Maquenne et Demoussy 1921). Or un examen attentif des taux de l'utilisation de l'acide gauche après 1, 2, 3 semaines, à savoir 5.2, 18.1, 27.2 p. c., nous apprend que l'action du cuivre devient plus sensible à partir de la deuxième semaine, c'est à dire à partir du moment où commence d'habitude la désintégration du mycélium.

Une dose plus forte de manganèse (0.01 p. c.) est sans effet sur la consommation de l'inverse gauche et sur l'oxydation spontanée de l'acide dans les fioles de contrôle.

L'addition d'un sel d'uranium ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$, 2/1000 d'une molécule par litre) précipita l'acide phosphorique. La diminution du taux observée dans cette série de cultures est attribuable à l'absence du phosphore.

Une dose plus forte de zinc (0.01 p. c.) ralentissait la croissance du champignon, mais était sans action sur le taux de l'utilisation de l'acide gauche.

g) A un moment donné nous avons pensé que l'aspergille utilise l'acide gauche pour la synthèse des substances protéiques et l'acide droit pour la construction des membranes et pour la respiration. Cette hypothèse a le mérite d'expliquer la raison pour laquelle l'utilisation de l'acide gauche ne dépasse pas 20 p. c. et a lieu simultanément avec celle de l'inverse droit. Un moyen simple de vérifier l'exactitude de cette hypothèse consiste à additionner les solutions nutritives de substances protéiques et d'abaisser ainsi le taux de l'utilisation de l'acide gauche. Dans les cultures contenant du racémate de sodium, l'addition de gélatine, de peptone, d'asparagine (60 mg. par fiole) fit effectivement baisser le taux de l'inverse gauche, mais cet effet doit être attribué à l'arrêt prématuré du développement de la moisissure, causé par la réaction alcaline du milieu nutritif. Cette réaction est le résultat de l'accumulation du sodium et de l'ammonium provenant des substances protéiques ajoutées et empêche l'aspergille d'utiliser complètement l'acide droit. Par contre l'addition de substances protéiques aux solutions nutritives constituées par de l'acide racémique libre (sans ammoniacque) ne fit non seulement pas baisser le taux de l'acide gauche, mais au contraire le fit assez sensiblement augmenter. Cette augmentation provient d'une part de la réaction un peu plus acide des solutions (absence de 11.3 mg. d'ammoniacque) et surtout du développement plus abondant du mycélium qui avait à sa disposition à côté des 300 mg. d'acide racémique, 60 mg. de substances d'une haute valeur nutritive.

TABLEAU IX.

Taux de l'utilisation des antipodes de l'acide malique (268 mg. par fiole).

semaines:	1	2	3
% <i>l</i> :	41.7	95.7	98.5
% <i>d</i> :	4.7	78.5	98.5

h) Acide malique: Ainsi qu'il résulte du tableau IX, notre aspergille assimile facilement les deux antipodes de l'acide malique et il n'y a qu'une différence dans les vitesses de l'assimilation, l'acide gauche étant utilisé plus rapidement que l'acide droit. Or il est intéressant de noter que l'acide plus rapidement consommé appartient par sa configuration au groupe de l'acide tartrique lévogyre (Freudenberg 1923, Lowry 1935, Kortüm 1932). On peut en inférer que l'acide malique exercera peut-être une

influence sur l'utilisation de l'acide tartrique gauche. Nous avons donc cultivé l'aspergille sur trois milieux nutritifs différents: le premier était composé d'acide racémique additionné d'acide malique lévogyre, le second de tartrate gauche d'ammonium additionné également d'acide malique gauche. La dernière solution contenait du tartrate gauche d'ammonium et de l'acide malique inactif. L'acide malique fit monter le taux de l'utilisation de l'acide tartrique gauche, mais remarquons le, seulement s'il était optiquement actif. L'addition d'acide malique inactif avait un effet contraire et faitsai baisser ce taux. Comme nous avons l'intention de revenir prochainement sur ce sujet, nous nous bornerons à faire quelques remarques. En particulier, il nous est impossible de discuter ici en détail les expériences remarquables de Mac Kenzie et de ses collaborateurs (1915, 1935) sur la précipitation des tartrates acides par l'acide malique actif (v. aussi Ritschie 1933). On pourrait objecter que le taux plus élevé observé dans les cultures composées d'acide racémique et d'acide malique gauche est dû à un développement plus abondant du mycélium; l'acide malique constitue en effet une bonne source carbonnée supplémentaire. On ne saurait cependant soulever la même objection à l'égard des cultures composées de tartrate gauche (150 mg.) et d'acide malique gauche en quantité équivalente au tartrate droit (134 mg.). A notre avis la différence observée entre l'action de l'acide malique lévogyre et l'acide inactif tient à ce que dans le premier cas nous faisons intervenir dans la solution nutritive un agent de dissymétrie dans les sens formulé par Pasteur (1860, 1883)¹).

5. Acide tartrique gauche et acide tartrique inactif. *Aspergillus fumigatus* ne se développe pas sur des milieux nutritifs formés par de l'acide tartrique lévogyre pur ou par de l'acide inactif, isomère des acides tartriques actifs.

6. Après avoir exposé les résultats expérimentaux de nos recherches passons aux conclusions.

a) Nous confirmons les résultats des recherches antérieures qui établirent que le pouvoir électif des moisissures par rapport aux inverses optiques de différents acides racémiques a un caractère

¹) Le taux plus élevé observé dans les cultures additionnées de peptone ou de gélatine est peut-être également attribuable, en partie du moins, à l'action exercée par des substances actives analogues à l'acide malique gauche.

relatif, les deux formes optiques étant consommées à des vitesses différentes. Le rapport des taux de l'utilisation de l'acide droit et de l'acide gauche s'élève à 5·5 et 10·0 (v. Tableau II), suivant le type de la solution nutritive employée. Ces valeurs doivent être considérées comme élevées; en effet, les valeurs du même rapport trouvées par d'autres auteurs sont dans la plupart des cas des nombres compris entre 1 et 3.

b) L'utilisation de l'acide gauche se fait simultanément avec celle de l'acide droit, cependant au cours de la première semaine l'assimilation de l'acide droit est relativement plus forte que celle de l'acide gauche par rapport à l'assimilation pendant la seconde semaine. L'épuisement de l'inverse droit arrête presque immédiatement l'utilisation de l'inverse gauche. Il s'agit d'expliquer comment il se fait que l'aspergille qui possède le pouvoir d'utiliser l'acide gauche, semble le perdre complètement après la disparition de l'acide droit. L'explication qui nous paraît la plus vraisemblable consiste à admettre que la vitesse de l'assimilation de l'inverse gauche est trop faible pour assurer le fonctionnement normal des processus vitaux. L'addition d'acide droit ou d'une autre substance facilement assimilable tel que l'acide malique, en faisant monter la vitesse des processus vitaux au-dessus d'un certain minimum, rend également possible l'utilisation de l'acide gauche. Nous avons fait remarquer que le taux de l'inverse gauche utilisé, augmente encore un peu après la disparition de l'acide droit. Ce phénomène s'explique par l'utilisation des réserves accumulées dans le mycélium¹⁾.

c) Un coup d'oeil sur le graphique 2 ou 3 peut donner l'impression que l'utilisation de l'acide lévogyre est modifiée par de nombreux facteurs. Il résulte toutefois des remarques dont nous avons accompagné l'exposé de nos résultats expérimentaux, que la majorité des agents étudiés est sans action sur le phénomène physiologique qui nous intéresse. Les uns, comme le fer ou le cuivre, provoquent des oxydations qui n'ont rien affaire avec les processus vitaux de l'aspergille. En déformant les molécules de l'acide tartrique gauche, les autres, tels que l'acide borique, le molybdate ou enfin l'acidité des solutions, ralentissent sa consommation et ne

¹⁾ Le poids sec des mycéliums atteint sa valeur maxima vers la deuxième semaine et décroît ensuite.

peuvent être considérés comme des facteurs qui agissent sur le champignon. L'élévation du taux observée après l'addition de substances protéiques s'explique facilement par le développement plus abondant du mycélium. Les modifications obtenues par la réduction des sels minéraux y compris l'azote ou par l'addition d'acide malique lévogyre, sont attribuables à des changements dans les propriétés physiologiques de l'aspergille. La baisse du taux causée par la dose insuffisante de sels minéraux mériterait une étude plus détaillée, quoique l'effet observé ne présentât rien d'exceptionnel et pouvait être prévu. Les résultats des cultures additionnées d'acide malique sont plus intéressants. Comme nous l'avons déjà dit l'antipode gauche de cet acide est plus rapproché de l'acide tartrique gauche par sa configuration spatiale; néanmoins, contrairement aux prévisions, son assimilation est plus rapide que celle de l'acide droit. Les résultats de nos recherches semblent nettement indiquer que sa présence dans les solutions nutritives exerce une influence sur l'aspergille, qui se manifeste par l'utilisation plus intense de l'acide tartrique gauche. Différents auteurs ont noté des observations qui rappellent nos résultats. Ainsi d'après Péré (1897, 98) on peut modifier le sens et la valeur du pouvoir rotatoire de l'acide lactique produit par certaines bactéries du genre *Bacterium coli*, en remplaçant les sels ammoniacaux par du peptone. Des résultats analogues ont été annoncés par Pottevin (1898). Un fait intéressant et d'une nature différente a été découvert par Pederson, Peterson et Fred (1926). Ils cultivèrent dans la même solution nutritive deux espèces de bactéries dont l'une produisait normalement de l'acide lactique gauche, tandis que l'autre était incapable de produire une fermentation lactique. L'acide lactique formé dans le milieu nutritif inoculé par les deux espèces de bactéries contenait à côté de l'inverse gauche également une quantité variable d'acide lactique droit. Ces changements du pouvoir rotatoire sont dus à notre avis à l'intervention d'un agent de dissymétrie: soit à du péptone ou à des bactéries et dans notre cas à de l'acide malique lévogyre. Il résulte plus particulièrement de nos recherches que par rapport aux antipodes de l'acide racémique, le pouvoir électif de notre aspergille est une propriété fixe sur laquelle les conditions extérieures n'ont pas d'influence. Si l'on néglige les effets produits par la pénurie de sels minéraux, c'est, semble-t-il, l'étude des agents dissymétriques qui permettra,

comme le prévoyait Pasteur, d'approfondir nos connaissances sur le rôle et la signification des inverses optiques en biologie¹⁾.

Le présent travail a été exécuté au Laboratoire de Botanique de l'Université des Jagellons à Cracovie. Je profite de cette occasion pour exprimer mes remerciements à M. le Prof. Dr. K. Ruppert pour les précieux conseils et l'intérêt qu'il me témoigna au cours de mes recherches (1933—36). Je tiens également à remercier MM. les professeurs J. Włoddek et Wł. Szafer des polarimètres qu'ils mirent à ma disposition et exprimer ma reconnaissance à mon ami et collègue le Dr. K. Strzemiński pour l'aide apporté dans la détermination des ions d'hydrogène et pour ses conseils. J'exprime ma profonde gratitude au Conseil de la Faculté Agronomique pour le prix Lesser qu'il m'a accordé et qui me permit de me procurer divers ouvrages en rapport avec mes recherches.

Sommaire.

1. Cultivé sur une solution nutritive additionnée d'acide racémique à 1·2 p. c. *Aspergillus fumigatus* utilise complètement après 3 semaines l'inverse droit et à peine 18·0 ou 9·7 p. c. de l'inverse gauche, suivant que la solution contient de l'acide libre ou son sel acide d'ammonium. Ces taux ne changent plus après les 2 ou 3 semaines suivantes. L'utilisation de l'acide gauche a lieu simultanément avec la consommation de l'acide droit et cesse dès que celui-ci est épuisé.

2. L'auteur a étudié l'influence de différents agents sur le taux de l'utilisation de l'antipode gauche de l'acide racémique. Les variations de la température, de la concentration de l'acide, l'addition de sels de certains métaux (fer, manganèse, uranium, calcium, strontium), l'addition d'asparagine, de peptone ou de gélatine ne produisaient aucun effet appréciable.

3. En employant des solutions nutritives moins acides, en ajoutant des substances qui forment des combinaisons complexes avec les acides tartriques (acide borique, molybdate), ou enfin en réduisant la dose normale de sels minéraux ou d'azote, on arrive à abaisser le taux de l'acide gauche utilisé par l'aspergille. L'auteur attribue les résultats obtenus avec les deux premiers agents à une

¹⁾ Le lecteur trouvera dans le mémoire de Gause (1936) un exposé d'ensemble du problème de la dissymétrie en biologie.

déformation des molécules de l'acide tartrique gauche qui empêche à un certain degré son utilisation par le champignon.

4. Si l'on additionne la solution nutritive d'acide malique lévogyre, on fait monter jusqu'à 30 p. c. le taux de l'acide gauche utilisé. L'acide malique inactif a un effet contraire et fait baisser le taux en question. L'augmentation du taux causée par l'addition d'acide malique actif est attribuable à l'intervention d'un agent de dissymétrie dans la solution nutritive. L'augmentation du taux, observée dans les cultures additionnées de cuivre est due à une action stimulante de ce métal sur les agents d'oxydation qui du mycélium ont pénétré dans la solution nutritive.

5. *Aspergillus fumigatus* ne se développe ni sur l'acide tartrique gauche pur, ni sur l'acide tartrique inactif. Cultivé sur de l'acide malique racémique, il utilise facilement les deux antipodes, toutefois plus rapidement l'inverse gauche que le droit.

Laboratorium Botanicum Janczewskianum (Cracovie).

Bibliographie.

- 1) Fischer E. 1880, Ber. chem. Ges. **23**, 370. — 2) Freudenberg K., Brauns F. & Siegel H. 1923, Ber. chem. Ges. **56**, 193. — 3) Gause G. F. 1936, Raumaufbau des Protoplasmas, Ergeb. Biologie, **13**. — 4) Gernez D. 1866, C. R. **63**, 843. — 5) Górski F. 1937, Bull. Acad. Polon. Sc. Ltrs. Ser. A. — 6) Holleman A. F. 1898, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, **17**, 83. — 7) Kortüm G. 1932, Neue Anschauungen über die optische Aktivität chemischer Moleküle, Stuttgart. — 8) Lewkowitsch J. 1883, Ber. chem. Ges. **16**, 1568. — 9) Lowry T. M. 1935, Optical rotatory power, London. — 10) Mac Kenzie A. & Harden A. 1903, J. chem. Soc. **83**, 424. — 11) Mac Kenzie A. 1915, ibidem, **107**, 440. — 12) Mac Kenzie & Christie E. W. 1935, Bioch. Zs. **277**, 122. — 13) Maquenne R. & Demoussy, 1921, Ann. Sc. Agron. p. 113. — 14) Mosseray R. 1932/3, La Cellule, **41**, 113. — 15) Palit C. C. & Dhar N. R. 1934, J. Indian Chem. Soc. **11**, 471. — 16) Pasteur L. 1857, C. R. **45**, 1032 (Oeuvres, II, 18). — 17) Pasteur L. 1858, ibid. **46**, 46 (Oeuvres, II, 25). — 18) Pasteur L. 1860, (Oeuvres, I, 342, Paris Masson 1922). — 19) Pasteur L. 1883 (Oeuvres, I, 376). — 20) Pederson C. S., Peterson W. H. & Fred E. B. 1926, J. biol. Chem. **68**, 150. — 21) Péré A. 1897, Ann. Pasteur **11**, 600. — 22) Péré A. 1898, ibid. **12**, 63. — 23) Pfeffer W. 1895, Jahrb. wiss. Bot. **28**, 206. — 24) Pottevin H. 1898, Ann. Pasteur **12**, 49. — 25) Pringsheim H. 1910, Zs. physiol. Chem. **65**, 96. — 26) Ritchie P. D. 1933, Asymmetric synthesis and asymmetric induction, London. — 27) Schulze E. & Boshard E. 1886, Zs. physiol. Chem. **10**, 134. — 28) Schulze E. & Likiernik K. 1891, Ber. chem. Ges. **24**, 669. — 29) Ulpiani C. & Condelli S. 1900, Gazz. chim. ital. **30**, 382.

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES
ET DES LETTRES
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

DERNIERS MÉMOIRES PARUS.

N° 8—10 B I, 1936.

- Dyakowska J.** Researches on the rapidity of the falling down of pollen of some trees (Planche 11).
- Krzemieniewski S. und Kovats J.** Über den Einfluß von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum* Beij.

N° 1—4 B II, 1937.

- Dembowski J.** Beiträge zum Instinktproblem (Planche 5).
- Gallera J.** Sur le téloblaste des embryons platyneuriques (Planches 3—4).
- Gatty-Kostyal M., Paszkowska M. and Zakrzewski Z.** The Influence of Certain Organic Substances on the Growth of Transplanted Tumors.
- Grossfeld H.** Stoffaufnahme und Amöboidbewegung. I. Die Bedingungen des Auftretens sichtbarer Amöboidbewegung an absterbenden Gewebezellen.
- Janiszewska J.** Das dritte und das vierte Larvalstadium von *Contracoecum aduncum* (Rud) aus dem Darne der Flunder, *Pleuronectes flesus* L. (Planche 1).
- Niesiołowski W. und Wojtusiak R. J.** Über die Verbreitung der geographischen Formen von *Erebia manto* Esp. in den Karpathen, mit besonderer Berücksichtigung der Ostkarpathen ((Planche 7).
- Świenty W.** Über ältere Entwicklungsstadien der Arterien und Venen im Flügel des Huhns.
- Tur J.** Sur l'étendue de l'action néoplasmodène de la cautérisation blastodermique (Planche 2).
- Zacwilichowski J.** Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten eines erworbenen Merkmales bei den Nachkommen des Schwammspinners *Lymantria dispar* L. (Planche 6).

TABLE DES MATIÈRES.

Janvier—Mai 1937.

	Page
J. LILPOP. New Plants from the Permocarboneous Rocks in Poland. I. (Planche 1)	1
H. und S. KRZEMIENIEWSKI. Die zellulosezersetzenden Myxobakterien (Planches 2—4)	11
H. und S. KRZEMIENIEWSKI. Über die Zersetzung der Zellulose durch Myxobakterien	33
J. BADIAN. Sur la cytologie des Levures (Planche 5)	61
F. GÓRSKI. Recherches sur l'utilisation des antipodes optiques de l'acide racémique par <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	89

Le »*Bulletin International*« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries. La première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) se divise en deux sous-séries; l'une d'elles »I« contient les mémoires qui se rapportent aux diverses branches de la Botanique (la Systématique, l'Anatomie et la Physiologie des Plantes), l'autre »II« est réservée aux publications qui concernent le vaste domaine des recherches morphologiques et physiologiques sur l'homme et les animaux (Anatomie, Biologie générale, Embryologie, Histologie, Physiologie, Psychologie, Zoologie systématique et expérimentale).

Depuis 1928, le »*Bulletin International*« ne contient que les communications dont l'étendue ne dépasse pas une limite strictement définie; les mémoires de plus vaste envergure sont réunis en un Recueil différent, les »*Mémoires*« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles). Les *Mémoires* sont également publiés en deux séries: A et B. Chaque mémoire publié dans les *Mémoires* se vend séparément.

Les abonnements relatifs au »*Bulletin International*« sont annuels et partent de Janvier. Les livraisons de ce Recueil se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à l'Académie ou à la Librairie »Gebethner et Wolff« Rynek Gł., Cracovie (Pologne).