Elektronenmikroskopische Untersuchung an intrazellulär lebenden Einzellern in Foraminiferen

Electron Microscopic Study on Intracellular Microorganisms in Foraminifera

DIETER SCHWAB

Universität Konstanz, Fachbereich Physik

(Z. Naturforsch. 26 b, 1341—1344 [1971]; eingegangen am 2. September 1971, revidiert am 30. September 1971)

In the cytoplasmic vacuoles and lacunas of the monothalamous foraminifera *Myxotheca arenilega* and *Allogromia laticollaris* unicellular organisms of about 2,5–6 μm appear, which persist intracellularly, showing no disintegration, even after a long starvation period of the host.

The mono- or multinucleated cells show a well developed dense endoplasmic reticulum, a large number of ribosomes, elongated mitochondria of the tubulus type, a few Golgi-complexes and paired centrioles or basal bodies. The cells are surrounded by a sheath of about 0.1 μm , consisting of numerous lamellae in a loose arrangement together with osmophilic substances. It is presumed that this protects the cells against digestion by the host. Since foraminifera which contain these organisms show no differences in growth and size at the end of their developing period compared to those cells which are free from these organisms, it is doubted that these organisms are parasites. They are also presumably not symbiotic organisms, since they possess no thylacoids. It is likely that they are harmless commensals. Their systematic position is unknown.

Wie lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen, können nicht nur Metazoen, sondern auch Protozoen von Einzellern befallen werden, die in ihrem Wirt parasitieren oder mit ihm in Symbiose leben^{1,2}.

Viele Foraminiferenarten erscheinen wegen ihrer Zellgröße als Wirt besonders geeignet, und in einer Reihe lichtmikroskopischer Arbeiten liegen Nachweise über Symbionten in Foraminiferenzellen vor^{3–8}.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an intrazellulär in Foraminiferen lebenden Einzellern wurden bisher nicht durchgeführt.

Material und Methoden

Die Kultivierung der monothalamen Foraminiferen *Myxotheca arenilega* und *Allogromia laticollaris* (Fam. Allogromiidae) ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden.

Es wurden unter anderem verschiedene Entwicklungsstadien beider Foraminiferen untersucht, die schon 10 Tage oder länger gehungert hatten, so daß alle Futterorganismen (*Chlorella*), die vorher von der Zelle

aufgenommen waren, aus dem Cytoplasma verschwunden waren. Die Foraminiferen wurden in 1/15 M phosphatgepufferter 1-proz. OsO_4 , pH 7,2, fixiert, in Äthanol entwässert und in Epon eingebettet.

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Reichert Ultramikrotom unter Verwendung von Glasmessern hergestellt und sowohl mit Uranylacetat als auch mit Bleicitrat kontrastiert.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Siemens Elmiskop 101 bei 60–80 kV und Primärvergrößerungen von 3000–20000 hergestellt.

Ergebnisse

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Stadien des Generationswechsels der Foraminiferen *Myxotheca arenilega* und *Allogromia laticollaris* haben gezeigt, daß die Zellen gleicher Entwicklungsstadien elektronenoptisch keine Unterschiede zu den bereits beschriebenen Zellen aufweisen^{11,12}. Das Cytoplasma ist, abhängig vom Alter der Zelle, von mehr oder weniger zahlreichen Vakuolen und Lakunen aufgelockert. Diese Räume können eine fein granuläre Struktur zeigen und ent-

Sonderdruckanforderungen an Dr. DIETER SCHWAB, 1. Anatomisches Institut der Universität des Saarlandes, D-6650 Homburg/Saar.

¹ F. DOFLEIN u. E. REICHENOW, Lehrbuch der Protozoenkunde, 6. Auflage, Fischer-Verlag, Jena 1949–1953.

² K. G. GRELL, Protozoologie, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968.

³ F. W. WINTER, Arch. Protistenkunde 10, 1 [1907].

⁴ L. RHUMBLER, Teil 1 und 2, Humboldt-Stiftung, Plankton-Expedition, Ergebn. 3, 1 [1911–1913].

⁵ W. L. DOYLE and M. M. DOYLE, Papers Tortugas Lab. 32, 127 [1940].

⁶ R. H. HEDLEY, Int. Rev. gen. exp. Zool. 1, 1 [1964].

⁷ J. J. LEE, H. D. FREUDENTHAL, V. KOSSOY, and A. BÉ, J. Protozool. 12, 531 [1965].

⁸ J. J. LEE and W. ZUCKER, J. Protozool. 16, 71 [1969].

⁹ D. SCHWAB, Z. Zellforsch. 96, 295 [1969].

¹⁰ D. SCHWAB, Z. Zellforsch. 108, 35 [1970].

¹¹ D. SCHWAB, Z. Zellforsch. 96, 295 [1969].

¹² D. SCHWAB, Z. Zellforsch. 108, 35 [1970].

halten bei Nahrungsangebot Futterorganismen. Läßt man die Foraminiferen hungern, so ist das Cytoplasma innerhalb weniger Tage frei von Futterorganismen. In den Zellen, die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen, sind in den Vakuolen und Lakunen einzellige Organismen anzutreffen, die auch trotz einer länger als vierzehn Tage dauernden Hungerperiode nicht verschwinden (Abb. 1 bis 5). Im Gegensatz zu den Futterorganismen, bei welchen immer verschieden weit fortgeschrittene Stadien der Auflösung in einer Foraminiferenzelle zu beobachten sind, zeigen diese Einzeller keinerlei Auflösungserscheinungen. Ihre Anzahl in einer Vakuole der Foraminifere variiert zwischen 1 und 6 (Abb. 1 * und 2).

Die Zellgröße dieser einzelligen Organismen reicht von 2,5 μm bis 6 μm . Jede Zelle besitzt neben ihrer Zellmembran außen noch eine mehrschichtige Hülle von etwa 0,1 μm , welche die Zelle wie eine Schale umgibt (Abb. 4 und 5). Sie besteht in ihrer Feinstruktur im Schnittbild aus parallel zur Zellmembran verlaufenden Lamellen, von denen mehrere locker übereinandergeschichtet sind (Abb. 4 und 5). Dazwischen ist osmiophiles amorphes Material in unterschiedlich dichter Packung sichtbar. Außerhalb der Schale sind stark osmiophile Substanzen in so großer Menge anzutreffen, daß häufig der gesamte Raum der Vakuole damit angefüllt ist (Abb. 1–5). Daneben sind auch fädige Strukturen sichtbar. Vakuolen, die Chlorella enthalten, lassen diese osmiophilen Substanzen nicht erkennen. Die Zellen selbst zeichnen sich durch ein ungewöhnlich dichtes Cytoplasma aus, welches durch ein stark ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum und die sehr zahlreichen Ribosomen charakterisiert ist (Abb. 4 und 5). In einzelnen Bezirken der Zelle jedoch, häufig in Kernnähe, ist das Cytoplasma ribosomenfrei und die granuläre Zellgrundsubstanz, die hier keine Zellorganellen erkennen läßt, wird vom übrigen Cytoplasma durch Membranen getrennt, von denen immer zwei parallel nebeneinander verlaufen (Abb. 1 und 5).

Im Cytoplasma sind als Reservestoffe Lipoidtropfen zu erkennen. An der Zellperipherie sind regelmäßig Vesikel sichtbar, die mit dichten Substanzen angefüllt sind (Abb. 9). Daneben treten „multivesiculated bodies“ in unterschiedlicher Anzahl und Größe auf. An Zellorganellen werden Mitochondrien

vom Tubulus-Typ nachgewiesen, die im Schnittbild als Schläuche die ganze Zelle durchziehen können. Golgi-Komplexe werden selten angeschnitten. Sie sind etwa 1 μm lang und stehen immer über ein Vesikelfeld mit der Kernhülle in Verbindung. Der Zellkern ist etwa 1 μm groß und meist gelappt. Die Kernhülle weist zahlreiche Kernporen auf. In der granulären Kerngrundsubstanz können 1 bis 4 Nukleolen mit oftmals unterschiedlicher Elektronendichte angetroffen werden (Abb. 3). In einigen Zellen konnten bis zu 5 Kerne angeschnitten werden. Bemerkenswert ist, daß in vielen Zellen an der Kernhülle paarige Centriole bzw. Basalkörper auftreten (Abb. 6–10). Kernteilungsstadien mit einer Teilungsspindel konnten jedoch bisher nicht beobachtet werden. Im Querschnitt sind die für Centriole bzw. Basalkörper typischen neun Gruppen zu je drei Mikrotubuli zu erkennen. Vereinzelt können ausgehend von diesen Organellen Mikrotubuli nachgewiesen werden, die im Cytoplasma verlaufen (Abb. 9). In den Zellen fallen weiterhin langgestreckte Vesikel auf, die parallel zueinander ausgerichtete Fibrillen enthalten (Abb. 5); ähnliche Strukturen wurden in Zellen von *Labyrinthula coenocystis* nachgewiesen¹³.

Nicht nur innerhalb der Foraminiferen konnten diese einzelligen Organismen gefunden werden, sie treten auch frei in der Kulturschale auf (Abb. 10). Dann jedoch sind in ihrem Cytoplasma nur vereinzelt Lipoidtropfen sichtbar, und in den Kernen sind keine Nukleolen zu erkennen. Bewegungsorganellen, wie z. B. Geißeln, zeigen diese Zellen nicht. Die Schale bleibt zwar erhalten, die einzelnen Lamellen liegen jedoch dicht zusammen. Die äußeren Lamellen der Schale zeigen eine radiale Anordnung.

Diskussion

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschieden lange hungernder Foraminiferen haben gezeigt, daß die in beiden Foraminiferenarten der Familie der Allogromiidae auftretenden einzelligen Organismen keine Futterorganismen darstellen können. Diese Einzeller sind offensichtlich in der Lage, sich dem Verdauungsprozeß in der Foraminifere zu entziehen, denn es konnte nie ein Auflösungsstadium dieser Organismen, auch nicht nach längerer Hungerperiode der Wirtszelle, gefunden werden. Es liegt nahe anzunehmen, daß die stark osmiophilen

* Abb. 1–10 s. Tafel S. 1342 a–c.

¹³ D. PORTER, *Protoplasma* **67**, 1 [1969].

Substanzen, die außerhalb der Schalen um die Zellen in den Vakuolen anzutreffen sind, von den intrazellulär lebenden Organismen abgegeben werden, als Schutz vor einem enzymatischen Abbau durch den Wirt. Wie jedoch frühere Untersuchungen zeigen¹⁴, und wie auch Abb. 2 vermuten läßt, werden diese Substanzen mit großer Wahrscheinlichkeit von der Foraminifere in die Vakuole abgegeben, was dann als eine Abwehrreaktion der Wirtszelle gewertet werden kann.

Die intrazellulär lebenden Organismen scheinen sich viel eher nur mit Hilfe ihrer mehrschichtigen Schale vor einer Verdauung durch den Wirt zu schützen. Ob die äußeren Schichten der Schale vom Wirt abgebaut werden und die Zelle deshalb ihre Schale ständig synthetisieren muß, oder ob die Schale von lytischen Enzymen völlig unangreifbar ist, kann nicht entschieden werden. Für eine hohe Proteinsynthese der Zelle, die man in Zusammenhang mit der Schalenproduktion bringen kann, sprechen die sehr zahlreichen Ribosomen.

Die Ernährung der Organismen erfolgt wahrscheinlich nur durch Osmose bzw. Pinocytose, denn Nahrungsvakuolen mit Abbauprodukten konnten in den Zellen nicht nachgewiesen werden. Auf die Möglichkeit einer eigenen Lipoidsynthese scheint das Auftreten von Lipoidtropfen im Cytoplasma hinzuweisen. Die Zellen sind durch diese Reservestoffe an

Hungerperioden angepaßt. Da die Foraminiferen einen Generationswechsel besitzen, bei dem auch Gameten auftreten, die mit einer Größe von 3–5 µm sowohl für *Myxotheca* als auch für *Allogromia* z. T. kleiner sind als die in den Foraminiferenzellen gefundenen Organismen, werden diese Zellen vermutlich bei der Gametogenese in der Schale der Foraminifere mit Restcytoplasma zurückgelassen und somit zwangsläufig aus dem intrazellulären Milieu entlassen. Ihr Auftreten in der Foraminifere ist daher keine permanente, sondern eine temporäre Erscheinung. Da die Zellen keine Bewegungsorganellen zeigen, wird vermutet, daß die Neubesiedlung einer Foraminifere passiv über ihre Pseudopodien erfolgt, indem diese Organismen ebenso wie die Chlorellen in das Cytoplasma eingeschleust werden.

Verglichen mit Foraminiferenzellen, die frei von intrazellulär lebenden Organismen sind, zeigen die hier beschriebenen Foraminiferen keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und in der am Ende ihrer Entwicklungsphase erreichten Zellgröße. Deshalb wird vermutet, daß es sich bei den Einzellern in den Foraminiferen nicht um Parasiten, sondern um harmlose Endokommensalen handelt. Nachteilige Auswirkungen einer parasitären Lebensweise, die man nicht ausschließen kann, lassen sich vielleicht nur bei einem starken Befall des Wirtes erkennen. Es wird bezweifelt, daß es sich um Sym-

Abb. 1. Zwei einzellige Organismen, umgeben von osmiophilen Substanzen, in einer Vakuole (V) der Foraminifere *A. laticollaris*. N = Zellkern, M = Mitochondrien. Das umgebende Cytoplasma der Foraminifere ist reich an Vesikeln (v), Mitochondrien (M), Golgi-Komplexen (G) und osmiophilen Grana (g). S = Schale der Foraminifere. Vergr. 18000 : 1.

Abb. 2. Einzeller in einer Vakuole eines jungen Gamonten der Foraminifere *M. arenilega*. Die Zelle wird durch einen Plasmastrang (Pfeile) von der osmiophilen Substanz (Os) in der Vakuole getrennt. N = Zellkern, M = Mitochondrion, L = Lipoidtropfen. Vergr. 20000 : 1.

Abb. 3. Einzeller in *A. laticollaris*. Im dichten Cytoplasma sind 5 Zellkerne (N) mit Nukleolen (n) sichtbar. Vergr. 18000 : 1.

Abb. 4. Die Schale (S) des Einzellers besteht aus tangential zur Zellmembran verlaufenden Lamellen mit dazwischenliegenden osmiophiler Substanz. Im Cytoplasma sind zahlreiche Ribosomen zu erkennen. M = Mitochondrien, mb = multivesiculated body, N = Zellkern, L = Lipoidtropfen. Vergr. 40000 : 1.

Abb. 5. Intrazellulär lebender Einzeller in einer Foraminiferenvakuole mit Schale (S). Zellkern (N) mit anschließendem von Membranen begrenzten Zellgrundplasma, das frei von Organellen ist (Pfeil). mb = multivesiculated bodies, L = Lipoidtropfen, V = Vesikel, angefüllt mit parallel zueinander ausgerichteten Fibrillen. Vergr. 30000 : 1.

Abbn. 6–8. Anschnitte von paarigen Centriolen bzw. Basalkörpern (Pfeile). G = Golgi-Komplex, N = Zellkern. Vergr. 40000 : 1.

Abb. 9. Randzone eines Einzellers mit zahlreichen peripher angeordneten Vesikeln, die z. T. mit dichten Substanzen angefüllt sind (Pfeile). C = ein am Zellkern (N) lokalisierter Centriol bzw. ein Basalkörper, von dem einzelne Mikrotubuli ausgehen (Pfeil). N = Zellkern. Vergr. 40000 : 1.

Abb. 10. Einzeller außerhalb einer Foraminifere. Die Schale (S) besteht aus zahlreichen dicht zusammenliegenden Lamellen, die äußeren zeigen eine radiale Anordnung (Pfeile). M = Mitochondrien, N = Zellkern mit Centriol bzw. Basalkörper (C). Vergr. 30000 : 1.

¹⁴ D. SCHWAB, Z. Zellforsch. 96, 295 [1969].

bionten handelt, da diese Organismen keine Thylakoide wie die Zooxanthellen besitzen, die als Partner bei einigen Protozoengruppen gefunden werden¹⁵. Über die systematische Stellung dieser Organismen besteht noch Unklarheit. Diese Frage muß Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Organismen zur Ordnung der Flagellaten gehören, die in der

Foraminifere in einem geißellosen Stadium leben. Unter anderen Lebensbedingungen könnten ihre Centriole bzw. Basalkörper zu Geißeln auswachsen. Diese Vermutung wird gestützt durch Untersuchungen an parasitierenden Dinoflagellaten, bei denen ein Geißelverlust während ihrer parasitären Phase zu beobachten ist¹⁵.

¹⁵ K. G. GRELL, Protozoologie, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968.

Herrn Prof. Dr. K. G. GRELL, Zoologisches Institut Tübingen, danke ich für die Überlassung der Objekte. Frau SABINE FUCHS danke ich für ihre freundliche Mitarbeit.

Das Bürzeldrüsensekret des Bläßhuhns (*Fulica atra*)

The Uropygial Gland Fat of the Coot (*Fulica atra*)

JÜRGEN JACOB

Universität Hamburg

und

ALFRED ZEMAN

Unilever-Forschungsgesellschaft mbH, Hamburg

(Z. Naturforsch. 26 b, 1344—1351 [1971]; eingegangen am 11. Mai 1971, revidiert am 11. Juli 1971)

The composition of the uropygial gland waxes of the coot (*Fulica atra*) was investigated by GLC/MS-combination. As acidic components mainly 2,6,10- and 4,8,12-trimethyl-substituted fatty acids with a chain length of C₁₂—C₁₇ or C₁₄—C₁₇ were determined; besides 4,8,14-trimethyl-hexadecanoic acid and homologous series of 2-methyl-, 2,6-, 2,8-, 2,10-, 2,12-, 4,8-, 4,10- and 4,12-dimethyl- as well as 2,6,12- and 2,8,10-trimethyl-substituted fatty acids could be detected.

As alcoholic components homologous series of *n*-alkanols with a chain length of C₁₅—C₂₀ and 2-, 6-, 10- and 14-methyl-alkanols with a chain length of C₁₆—C₁₉ could be identified.

Die Untersuchungen der Bürzeldrüsensekrete verschiedener Vögel lassen eine chemotaxonomische Zuordnung ähnlicher Arten aussichtsreich erscheinen. Solche Untersuchungen liegen bislang aus der 11., 16., 17., 18., 20. und 32. Ordnung vor. Soweit mehrere Arten einer Ordnung untersucht worden sind, zeigen diese entweder in der alkoholischen oder sauren Komponente des Bürzelwachses charakteristische Übereinstimmungen.

Da uns mit dem Bläßhuhn (*Fulica atra*) ein Vertreter der 19. Ordnung (Grues, Kranichartige) zur Verfügung stand, erschien es reizvoll, zu überprüfen, ob es auch für diese Ordnung charakteristische Bürzelwachskomponenten gibt, die sich von den bisher untersuchten unterscheiden. Das Bläßhuhn ist ein in Nordeuropa weit verbreiteter und daher gut zugänglicher Schwimmvogel und gehört zur 9. Familie (Rallen) der 19. Ordnung.

Sonderdruckerfordernungen an Dr. JÜRGEN JACOB, D-2000 Hamburg 66, Kakenhaner Weg 14.

Material und Methode

Material

Die Bürzeldrüse eines weiblichen Bläßhuhns (Lütjenburg, Schleswig-Holstein) wurde präpariert, unter Aceton aufbewahrt und in der üblichen Weise aufgearbeitet¹.

Aufarbeitung

Die sauber präparierte Bürzeldrüse wurde homogenisiert und lieferte nach Extraktion mit Chloroform/Methanol (2 : 1) und Trennung der Phase mit Wasser die Rohlipide (106,7 mg), welche dünnenschichtchromatographisch im System CHCl₃ an Kieselgel-Fertigplatten (E. Merck) nach Anfärbung mit Chromschwefelsäure einen einheitlichen Fleck mit R_f=0,85 zeigten, der einem verzweigten Wachs entspricht. Ein Teil des Wachses (75,8 mg) wurde mit 5-proz. methanolischer HCl umgeestert, und das Gemisch aus Methylester und Alkoholen säulenchromatographisch an Kieselgel (5-g-Säule, Korngröße 0,125 mm, CHCl₃-gewaschen) ge-

¹ J. JACOB u. G. GRIMMER, Z. Naturforsch. 25 b, 54 [1970].