



Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

- + *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
- + *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
- + *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
- + *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter <http://books.google.com> durchsuchen.

Princeton University Library



32101 074861624

52
8852

.128

Library of



Princeton University.

Presented by
Charles Williston M. Aplin,
Class of '88.

Archiv für Protistenkunde

begründet von

Dr. Fritz Schaudinn

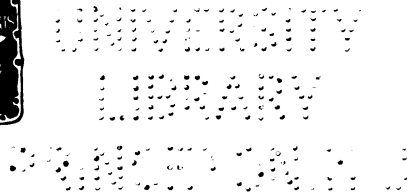
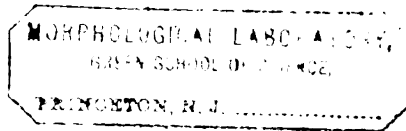
herausgegeben

von

Dr. M. Hartmann und **Dr. S. von Prowazek**
Berlin Hamburg

Einunddreissigster Band

Mit 24 Tafeln, 53 Textfiguren und 1 Diagramm



JENA
Verlag von Gustav Fischer
1913

(RECAP)

8852

. 128

Bd. 31

(1913)

Alle Rechte vorbehalten.

UNIVERSITY
OF
MICHIGAN
LIBRARY

Inhaltsübersicht.

Erstes Heft.

(Ausgegeben am 25. September 1913.)

Abhandlungen:

	Seite
WENYON, C. M.: Observations on <i>Herpetomonas muscae domesticae</i> and some allied flagellates. (With Plates 1—3, 6 figures in the text and 1 Diagram)	1
PROWAZEK, S. v.: Notiz zur <i>Herpetomonas</i> -Morphologie sowie Bemerkung zu der Arbeit von WENYON	37
FERROR, XENIA: Einige neue Befunde aus der Entwicklungsgeschichte von <i>Arcella vulgaris</i> (EHRBG.). (Mit Tafel 4)	39
PROWAZEK, S. v.: Studien zur Biologie der Protozoen. VI. (Mit Tafel 5 und 7 Textfiguren)	47
—: Aus dem Nachlaß von FRITZ SCHAUDINN. (Mit Tafel 6 u. 7)	72
WHERRY, WM. B.: Studies on the Biology of an Amoeba of the <i>Limax</i> Group. <i>Vahlkampfia</i> sp. No. I. (With Plate 8 and 9 and 8 figures in the text)	77

Zweites Heft.

(Ausgegeben am 10. Oktober 1913.)

Abhandlungen:

FIEBIGER, J.: Studien über die Schwimmblasencoccidien der Gadusarten (<i>Eimeria gadi</i> n. sp.). (Mit Tafel 10 und 9 Textfiguren)	95
BRAUCHAMP, P. DE: Recherches sur les Rhytidocystis parasites des Ophélies. (Avec les planches 11 et 12 et 9 figures dans le texte)	138
NÖLLER, WILHELM: Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Übertragung. I. Teil. (Mit Tafel 13—15 und 5 Textfiguren)	169
MENDELEEFF-GOLDBERG, POLINA: Die Immunitätsfrage bei der Trypanosomenkrankheit der Frösche. (Mit Tafel 16 u. 17 und 9 Textfiguren)	241

Drittes Heft.

(Ausgegeben am 23. Oktober 1913.)

Abhandlungen:

	Seite
SWELLENGREBEL, N. H.: Zur Kenntnis der Sporenbildung bei den Bakterien. (Mit Tafel 18)	277
KLITZKE, MAX: Über <i>Nebela collaris</i> EHRENBERG. (Vorläufige Mitteilung.) (Mit Tafel 19)	286
PIERANTONI, UMBERTO: Struttura ed evoluzione dell'organe simbiotico di <i>Pseudococcus citri</i> RISSO, e ciclo biologico del <i>Coccidomyces dacty-</i> <i>lopii</i> BUCHNER. (Colle tavole 20—22)	300
DOBELL, CLIFFORD: Observations on the life-history of CIENKOWSKI's "Arachnula". (With plates 23 and 24)	317
Kleinere Mitteilungen:	
HADLEY, PHILIP B.: Regarding "une nouvelle Coccidie aviaire, <i>Eimeria</i> <i>bracheti</i> (n. sp.)"	354

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

Observations on *Herpetomonas muscae domesticae* and Some allied flagellates.

With special Reference to the Structure of their Nuclei.

By

C. M. Wenyon, MB., BS., BSc.

Protozoologist to the London School of Tropical Medicine.

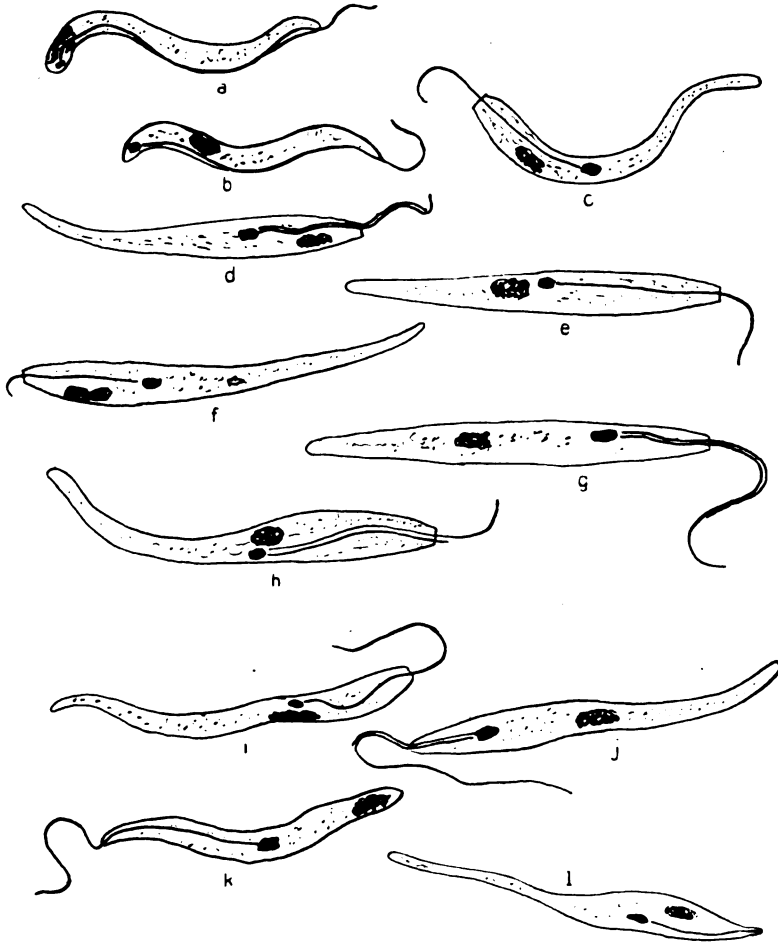
(With Plates 1-3, 6 Text figures and 1 Diagram.)

In a former paper (32) I described the structure and division of the nuclei of *Herpetomonas muscae domesticae* obtained from house flies in Bagdad. The preparations, from which the description was made, were prepared by smearing the gut contents of the flies upon slides allowing them to dry and then staining by GIEMSA's stain. I stated that great care had to be exercised in making deductions from the appearances resulting from this irrational method of treating such delicate organisms, but that certain arrangements of the nuclei and flagella were of such constant occurrence that they could not be entirely the result of bad fixation. During the summer of 1911 in Aleppo, Syria, I took the opportunity of preparing films from the gut contents of the house flies which I found infected to an equally great extent as those of Bagdad. On this occasion a more accurate method of preparation was used the films being fixed while wet in either SCHAUDINN's sublimate alcohol mixture or HERMANN's fluid. After fixation they were stained by HEIDENHAIN's iron haematoxylin method. In these preparations some most instructive pictures of the nuclei and flagellar apparatus were obtained.

The various types of flagellate encountered in the house fly.

In Bagdad flies I met with flagellates of three types. Firstly there was a large flagellate which was undoubtedly the *Herpetomonas muscae domesticae* of PROWAZEK, FLU, PATTON and others; secondly there was a smaller flagellate corresponding to the *Leptomonas* of FLU and ROUBAUD; and thirdly there was one which showed a trypanosome arrangement of its nuclei. The latter had been previously described by PATTON (20) under the name of *Rhyncodomonas luciliae* from the gut of *Lucilia serenissima* and *Musca nebulo* from the bazaars of Madras. They were found by him in the malpighian tubes and were very common in the *Lucilia*. In giving the new generic name PATTON considered the flagellate to be distinct from *Herpetomonas muscae domesticae* which however occurred in the gut of the same flies. ROSENBUCH (27), DUNKERLEY (11) and ALEXEIEFF (1) have met with these forms in the house fly, but they rightly regard them as representing merely stages in the life history of *Herpetomonas muscae domesticae*. ROUBAUD (28) found similar forms in flies in the Congo. They were associated with flagellates of the leptomonas type. ROUBAUD considered that two distinct flagellates were represented, one the biflagellate *Herpetomonas muscae domesticae* of PROWAZEK, the other a *Leptomonas*, a uniflagellate which changed into trypaniform individuals at certain stages of its life history. Similarly CHATTON and ALILAIRE (7) described, from various species of *Drosophila*, flagellates which occurred both in the leptomonas and trypanosome form. These were described as species of *Leptomonas*. In the Bagdad flies the trypanosome individuals occurred in the malpighian tubes, while the large and small leptomonas forms were in the intestine. I was then unable to decide whether the three forms were, or were not, different stages of one flagellate of the fly. I found the majority of the Aleppo flies infected with the large *Herpetomonas muscae domesticae*. Smaller leptomonas forms were also present and I am now convinced that they are merely stages of the larger flagellate for transition forms connecting the two types are common. Further I found in a few flies the same trypaniform flagellates that I encountered in Bagdad. From one fly with an enormous infection a most instructive preparation was obtained for in it were thousands of flagellates in what might be called the transition stage. Here every conceivable type from that of the typical *Herpetomonas muscae domesticae* to the typical trypaniform

or rhynchoidomonas individual was represented. A moment's glance at such a preparation is sufficient to convince any one that these flagellates of the trypanosome type are simply developmental stages of the true *Herpetomonas muscae domesticae*. ROUBAUD (28) and



Text figure J.

Flagellates from the house fly's gut to show how the typical leptomonas forms are transformed into the trypanosome type by a migration of the nuclei.

CHATTON and ALILAIRE (7) recognised these trypanosome forms as a stage in the life cycle of a *Leptomonas*, a uniflagellate which they thought to be distinct from the *Herpetomonas*, a biflagellate. In my preparation however many of the transition forms are just as

biflagellate as the typical *Herpetomonas muscae domesticae* itself, for not only is a transformation of the one type into the other taking place through a migration of the nuclei, but multiplication is going on at the same time, with the result that the biflagellate type is produced. If the transformation had been proceeding during what might be called the resting stage as far as longitudinal division is concerned, then the flagellate would have had the uniflagellate structure. In my other preparations showing these trypaniform individuals division is not proceeding actively so that the majority of the flagellates are uniflagellate, and they appear to correspond to ROUBAUD'S *Leptomonas*. The fortunate discovery of the preparation just referred to shows quite clearly that the true *Herpetomonas muscae domesticae* (PROWAZEK'S supposed biflagellate) likewise has a trypanosome stage. It comes to this, that the *Leptomonas* of ROUBAUD and others is merely a not actively dividing *Herpetomonas muscae domesticae* and that both may pass through a transition into flagellates of a trypanosome type. The outline figures (Text fig. I, a—l) drawn from this preparation show a few of the various transition forms. It should be mentioned that the preparation was a dried smear of the gut and malpighian tubes stained by GIEMSA'S stain and though unreliable for minute details, it is, quite satisfactory for the study of the general anatomy of the flagellate. The result of these observations is that all these flagellates of the house fly are to be regarded as belonging to one species namely *Herpetomonas muscae domesticae*.

General structure of the flagellate.

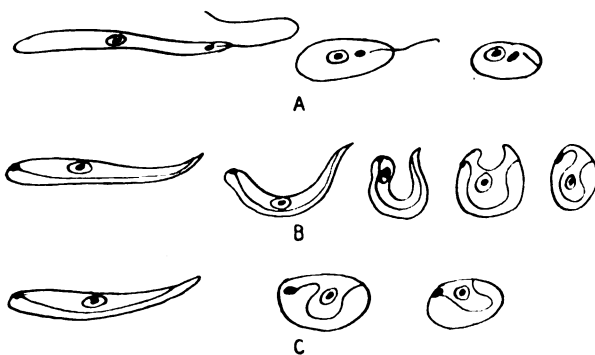
The body of the typical *Herpetomonas muscae domesticae* is leaf-like with one or two flagella directed forwards from the blunt anterior end. Its shape is well known and is clearly shown in the accompanying plates. The cytoplasm is divided into a thin outer hyaline ectoplasmic layer and a more granular endoplasm. The body appears to be covered by a definite periplast which is continued forwards as the sheath of the flagellum. Apart from the bacteria, to be mentioned shortly, the only structures which occur in the cytoplasm are the nuclei and flagellar apparatus. Very occasionally there occur near the nucleus deep staining granules (Fig. 2) but whether these represent chromatin extruded from the nucleus or are partially digested bacteria I am unable to say.

Between the elongate flagellate forms and the small oval non-flagellate bodies, to be described below, every intermediate form

can be found. As regards their nuclei and flagellar arrangement these intermediate forms have a similar structure to the elongate flagellates from which they differ only in the gradual approximation of the two nuclei. In the smallest forms the kinetonucleus may be in actual contact with the trophonucleus but I have never obtained any evidence that a fusion of the two nuclei may take place.

The production of the small round forms.

It is well known that these flagellates of the intestine of insects are transmitted from one host to another by small encysted forms which escape from the intestine and are taken up in the food of the next host. These cysts, as I have shown (33) in the case of a flagellate of the flea *Pulex irritans*, are able to withstand drying for 24 hours. In the case of *Herpetomonas muscae domesticae* such encysted forms are produced and are to be found in large numbers in the hind gut. Now the exact form these encysted stages assume depends on the structure of the flagellate from which they are



Text figure II. The three types of rounding off of the leptomonas and trypanosome individuals in preparation for cyst formation.

derived since they are developed both from leptomonas individuals as well as from those having the trypanosome structure. If derived from leptomonas forms the free flagellum is lost, the body becomes globular, and all that is left of the flagellum is a short rhizoplast running a straight course from the kinetonucleus to the surface of the body. Such a transformation is represented diagrammatically at Text fig. 2 A. If on the other hand the flagellate happens to be in the trypanosome stage at the time that the encystment process commences then the rounding off varies with this difference in

structure of the flagellate. The intracorporeal part of the flagellum is much longer in the trypanosome than in the leptomonas stage so in the rounding off there is much more flagellum to accommodate in the body. The trypaniform individual may give rise to the rounded forms either by a doubling of the body into a U shape, the space between the limbs of which becomes filled out with protoplasm (Text fig. 2 B); or the body simply contracts to a globular shape (Text fig. 2 C). In either case the result is the same and a rounded form is produced which differs only from that derived from the leptomonas type in the length of the intracorporeal part of the flagellum. I believe there is no essential difference between these two types of rounded form, and that they both serve the same purpose of transmission of the infection. There must be some stimulus, possibly some change in the intestinal contents of the fly, which causes cyst formation to take place. If this occurs when the flagellates are of the leptomonas type, then the cysts will be of type A. If however it occurs during the trypanosome phase then the cysts will be of the types B and C. The exact type of cyst to be produced thus appears to be in the nature of an accident.

A further notable feature is that during the progress of rounding off of any of these forms multiplication may take place so that some of the rounded individuals appear with two sets of nuclei and two rhizoplasts.

Is *Herpetomonas muscae domesticae* to be regarded as a biflagellate?

In my former paper (32), in agreement with PATTON (19), MACKINNON (16) and PORTER (21), I pointed out that the flagellate of the house fly was not a biflagellate as PROWAZEK (23) had maintained but that the forms showing the two flagella were the result of the precocious formation of new flagella in anticipation of a coming longitudinal division. This formation of new flagella may be so advanced that four flagella may be attached to the still undivided body in which are two sets of nuclei, themselves in process of division. The examination of the material collected in Aleppo has still further strengthened my opinion. It might seem superfluous to further emphasise this point, were it not that PROWAZEK (24) has again quite recently written in support of the biflagellate view. He admits that his earlier work upon this flagellate was based upon dried specimens stained by GIEMSA'S stain,

a method of preparation which he is not inclined to condemn as absolutely as some have done. However he states that he does not attach so much importance to the nuclear appearances described by him in his first paper, especially as regards the chromosomes and chromosome number. He does however adhere to the view that the flagellate in question has normally two flagella. As I have already stated, an examination of very large numbers of flagellates fixed by a wet fixation has further convinced me that my original description is correct. I found, as is usual in these flagellates, that the flagellum arose from a basal granule (or centrosome), and that it passed as a rhizoplast through the body to the surface and there became a free flagellum which was made up of two parts, a continuation of the rhizoplast and an ectoplasmic covering. The basal granule or centrosome divides sometimes very early and there grows out a new rhizoplast parallel to the old one and this gradually increases in length till it passes into the ectoplasmic sheath of the old flagellum. The new and the old flagella are thus very closely bound together. It generally happens that the new flagellum equals the old one in length before any division of the binding ectoplasmic sheath takes place with the result that there is produced the biflagellate of PROWAZEK, LINGARD and JENNINGS, ROUBAUD, ROSENBUCH, FLU and others. It is only by an examination of great numbers of dividing forms that the biflagellate appearance is recognised as representing a coming longitudinal division. Every stage from the early division of the centrosome with the newly formed rhizoplast growing out into a new flagellum can be traced. A most important point, already emphasised in my former paper, is this; the new rhizoplast and new flagellum are at first thinner than the old ones and they increase in thickness progressively with the increase in length so that when the lengths are equal they are of equal thickness. To anyone who approaches the question with an open mind, and who has the opportunity of examining a sufficiently large number of dividing forms, no other explanation can possibly offer itself. Yet PROWAZEK has reaffirmed his contention. It may be that the flies examined by him were not heavily infected.¹⁾

The flies of Bagdad examined by me contained myriads of para-

¹⁾ Since the above was written Dr. v. PROWAZEK has very kindly sent me one of his original preparations. The flagellates in this are identical with those here described and, as in my preparations, the flagellates with two flagella, either completely or incompletely developed, are, according to my interpretation dividing forms of a uniflagellate organism.

sites so that there was every opportunity of obtaining sufficient material to illustrate all stages of the division process. It has been asserted that those who have upheld the uniflagellate view have been dealing with a distinct organism. Such a statement is a mere begging of the question. In his original paper PROWAZEK (23) not only described *Herpetomonas muscae domesticae* as a biflagellate but asserted that another *Herpetomonas* of *Sarcophaga haemorrhoidalis* had the same structure so that there can hardly be any doubt that he was dealing with flagellates of the ordinary leptomonas type and which have since been found in a host of other insects. Frequently almost every flagellate found in a fly actually possesses two flagella. A careful examination of these shows, as I have already mentioned, that one flagellum is fully formed while the second is only partly developed. The two are so closely bound together that this may not be at first apparent. It might be urged that in such cases the flagellate is a biflagellate as in one sense it is. In the true meaning of the term however this designation cannot be applied to this flagellate unless it can be shown that in the biflagellate stage it is not dividing or preparing to divide. We find however that the possession of two flagella is a consequence of a previous division of the basal granule of the flagellum and karyosome of the kinetonucleus and is associated with a division of the trophonucleus leading to a longitudinal splitting of the body; so it is quite irrational to suppose that the possession of two flagella has any other significance than it has in those cases where the second flagellum does not commence to form so early in the division process. The fact that the basal granule may divide again before the division of the body is complete does not alter this point of view for here the same series of events is associated with the division. The case is exactly comparable with the divisions seen in certain trypanosomes. In the case of *Trypanosoma lewisi* repeated nuclear divisions may take place resulting in the production of bodies provided with several sets of nuclei and flagella; and similarly amongst the pathogenic trypanosomes reproducing actively in the blood of a rat it is not unusual to encounter large forms in which there are two large fully formed flagella and undulating membranes while the two sets of nuclei are again dividing and the two new flagella are beginning to grow out from the two divided basal granules. Such forms correspond exactly with the forms seen in *Herpetomonas muscae domesticae*. In the case of trypanosomes the precocious formation of flagella is however not such a common occurrence as in the case of the flagellate of the house fly. It is impossible

therefore to consider the house fly flagellate as a biflagellate even though every flagellate from any individual fly possesses two or more flagella since the possession of these is definitely associated with nuclear changes which never occur in allied flagellates apart from an approaching division of the body.

The question of a cytostome.

In his description of *Herpetomonas luciliae* from the alimentary tract of *Lucilia* of Cambridge, STRICKLAND (29) describes a small opening in the periplast sheath of the non-flagellate forms. It communicates with a liquid part of the endoplasm which is termed a cytopharynx, while the opening in the periplast is called a cytostome. In his recent paper PROWAZEK (24) figures an oval clear area in a non-flagellate form of *Herpetomonas muscae domesticae* and comes to the conclusion that it is the same structure as STRICKLAND's cytopharynx. From an examination of the wet fixed preparations I believe that such a structure does exist not only in the round or oval non-flagellate forms but also, in the elongate flagellates. Apart from the actual appearances presently to be described there is a reason for assuming that there must be some opening in the periplast sheath. Very frequently, at the hinder end of the body of the flagellate, embedded in the protoplasm, are rod-like structures which stain deeply with iron haematoxylin (Figs. 1, 4—8, 10). They show a decided tendency to bipolar staining. Nearly always the ends of the rods stain more intensely than the middle portion, so that they resemble bipolar staining bacteria some of which occur in the medium in which the flagellates are living. There appears to be little doubt that these structures in the flagellates are bacteria. It might be suggested, as I thought at one time, that they represent chromatin material extruded from the nucleus. Those who are familiar with some of SCHAUDINN's figures illustrating the transformation of the ookinete of *Halteridium* into a female trypanosome will recognise similar dark staining rods which SCHAUDINN described as reduction bodies given off by the nucleus. I was however unable to find any indication that the nucleus of *Herpetomonas muscae domesticae* gave off such chromatin bodies and I have no doubt that they are truly bacteria taken up in some way by the flagellate. The body of the parasite is limited by a definite periplast which retains its shape fairly regularly so that it is hardly conceivable that the bacteria could have been taken up through any part of

the unbroken periplast. It is this fact that renders the presence of a cytostome very probable.

In the majority of specimens fixed by the wet method it is seen that the end of the body from which the flagella arise is truncated and not continued as a tapering extremity along the flagellum. It is cut off quite sharply and in suitably stained specimens, where the extraction of the stain has not been too great, there appears to be a funnel-like depression leading from the anterior end towards the kinetonucleus (Fig. 6). In some cases it appears as if the funnel, which is represented by a more lightly staining area, is continued beyond the kinetonucleus after passing either behind or to the side of it. It terminates indefinitely in the endoplasm. I have not been able to decide whether there is a circular opening at the anterior end of the body or whether there is a slit-like groove extending down one face of the parasite. The latter view is more probably the correct one. In this case it appears as if the flagella lie on that wall of the groove which faces its opening (Fig. 6). It must be remembered that the body of the flagellate is not cylindrical but very much flattened, like a blade of grass. The presence of this groove or cytostome leading into the funnel-like cytopharynx explains the presence of the bacteria in the body. As will be seen from the figures the bacteria are always at the hinder end of the flagellate so that their passage from the cytopharynx through the endoplasm must be a rapid one. Whether they ultimately disintegrate by digestion or are extruded from the body has not been definitely settled. Certain appearances suggest that they may undergo a digestion as more irregular looking granules sometimes occur in the same situation (Fig. 6).

The presence of a tube or canal running the entire length of the body of this flagellate has been noted by LÉGER and others. It may be that the cytostome here described is the anterior portion of such a canal, a matter which is referred to again below in connection with the so called axostyle.

Nuclear and flagellar apparatus.

It is the main object of the present paper to describe the structure of the nuclei and flagellar connections of *Herpetomonas muscae domesticae*, for the flagellate is a fairly large one in which the nuclei and especially the kinetonuclei are easy to observe. It was thought that the investigation would throw some light upon

the structure of the kinetonucleus as it occurs in some allied flagellates in which this body is much smaller.

In the first place I will describe the appearances as seen in the wet fixed specimens of the flagellate of the Aleppo house flies and then I will compare these results with those obtained from some other flagellates prepared in the same manner.

Trophonucleus. The simplest type of nucleus seen in *Herpetomonas muscae domesticae* corresponds with the nuclei commonly seen in trypanosomes and allied flagellates. There is a fine nuclear membrane enclosing a space, in the centre of which lies the deeply staining karyosome (Figs. 5, 15, 45, 46). In certain instances where the stain has been sufficiently extracted a small granule is seen at the centre of the karyosome (Fig. 22). It probably represents the centriole. Though this is the simplest form of nucleus and may be taken as the type there are frequently departures from this plan. It is probable that the karyosome is built of three essential portions or substances. There is the chromatin material, the centriole and finally a plastin material which binds the two former together. In the type of nucleus described above the chromatin and plastin material seem to be intimately mixed into a fairly homogeneous mass while the centriole occupies its centre. In other cases apparently, the centriole may be outside the karyosome and even situated on the nuclear membrane (Figs. 48, 56, 71, 76). The chromatin instead of being evenly distributed through the plastin mass may be aggregated into clumps of irregular shape and size (Fig. 49). It is in the nuclear division that the various constituents of the nucleus reveal more clearly their true nature.

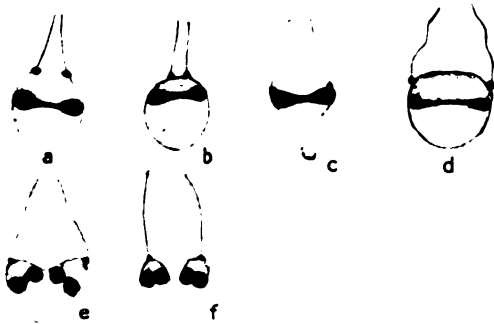
In the simplest division the centrally placed karyosome elongates; becomes constricted and finally divided into two parts (Figs. 6, 63, 65, 69, 75, 79, 81, 82). As the two halves of the karyosome separate they are often seen to remain connected by a less deeply staining band of varying thickness, the centrodosome which represents a connection between the separating halves of the divided centriole. In Fig. 81 are shown two nuclei commencing to divide in this way. In such cases where the chromatin and plastin material are closely associated it is difficult to make out the details of this division but in those cases in which the the centriole is separated from the main masses it is seen to be the first structure to divide. Dividing centrioles are shown in Figs. 47, 51, 64, 66, 74, 78. In all these cases it appears that the centriole divides by elongation and constriction and that usually the two halves remain connected by a centro-

desmose. The plastin material of the nucleus which may be intimately united with the chromatin into a single mass (Figs. 7, 10, 13, 51, 78) is then roughly divided into two parts while the halves of the centriole occupy polar positions (Figs. 52, 61). In other cases it is possible to distinguish in the plastin mass definite darkly staining chromatin granules (Figs. 53, 73, 74). Sometimes such chromatin bodies are arranged at the equator of the plastin mass while the two daughter centrioles occupy its poles (Fig. 50). In these cases it seems as if there is an attempt at mitotic division; but this arrangement is so seldom seen that it appears to be merely accidental. It would certainly be possible to pick out isolated instances, and by grouping them in series to produce a picture showing various stages of a mitosis in which bodies resembling chromosomes are formed and divided. It would however give a very false picture of the true nuclear division which appears to proceed quite irregularly. In some cases the dividing centriole with the centrodosome occupies the central position in the nucleus while the chromatin and plastin bodies are arranged quite irregularly on the nuclear membrane (Figs. 1, 4, 67). Though the nuclear division may proceed in such a variety of ways it is always according to the plan which is commonly seen in nuclear division in allied flagellates. The centriole produces a centrodosome while the remainder of the nuclear material consisting of one or more masses made up of plastin and chromatin material, either closely united or not, is roughly divided into two parts under the influence of the daughter centrioles. In Figs. 58, 69, 72, 79 nuclei are shown in which there are bodies staining like chromatin situated upon the nuclear membrane. In one of these (Fig. 5, 8) the centrioles are clearly visible within the karyosome. The bodies may be merely chromatin material but in other cases already mentioned (Figs. 51, 64, 66) similar granules appear to be dividing like centrioles, and I have assumed them to be of this nature. It is possible however that the appearances of division are merely accidental as also the granules which I have considered to be daughter centrioles in Figs. 61 and 77. It is possible that in every case the centriole is within the karyosome and that the granules on the nuclear membrane and lying apart from the general karyosome mass are simply separate chromatin bodies. The Figs. 45 to 82 give a fairly good average of nuclear appearances in this flagellate and show very clearly how difficult it is to trace out any definite type of nuclear division. It is quite possible that other observers would be inclined to place a different

interpretation upon these appearances; but I am convinced that more cannot be done in the way of fixing the nature of the various constituents of the nucleus as seen in such preparations without incurring the possibility of serious error.

Kinetonucleus. The typical kinetonucleus in the sublimate fixed specimens is shown in Fig. 8 which illustrates a dividing flagellate. It will be seen that there is a clear area (Figs. 1—10) surrounding an elongate deeply staining body. The latter is the real kinetonucleus and within it there is a still more deeply staining body which generally produces a swelling on each side of the kinetonucleus. This mass is the karyosome. The clear space round the kinetonucleus is produced by a shrinking of the kinetonucleus and cytoplasm as a result of fixation. MINCHIN (17) has shown that a similar clear area is produced around the nucleus of *Trypanosoma lewisi* fixed in the same manner. With the shrinking the basal granule or granules leave the surface of the kinetonuclear membrane, their normal position, and come to lie on the margin of the clear area. The latter sometimes appears to be limited by a membrane and it might give rise to the idea that it represents the nuclear membrane of the kinetonucleus. Such a view is found to be incorrect from an examination of specimens fixed in HERMANN'S fluid. The membrane limiting the clear area is undoubtedly an artificial product of fixation. In specimens fixed in HERMANN'S fluid (Figs. 12—15, 22) the staining varies. Instead of the entire kinetonucleus colouring deeply as in the sublimate specimens the karyosome alone stains while the remainder of the kinetonucleus is unstained, and is seen to be limited by a nuclear membrane (Figs. 12, 14, 22). In these specimens also there is not the contraction produced by the sublimate, so that there is no shrinking of the cytoplasm away from the nuclear membrane; consequently the basal granules lie on the latter structure. With HERMANN'S fluid there is, if anything, a swelling of the kinetonucleus which makes it appear larger than it really is. Why there should be this difference in the staining in the two series of preparations I am unable to say but it must depend on some difference in the chemical action of the two fixatives. Though in the deeply stained kinetonucleus of the sublimate fixed specimens the still more deeply staining karyosome (Figs. 3, 8, 9) can be made out it is much more clearly shown in the flagellates fixed in HERMANN'S fluid. The division of the karyosome is one of the earliest signs of a coming division of the flagellate. An undivided karyosome is seldom seen except in a dividing flagellate where the daughter

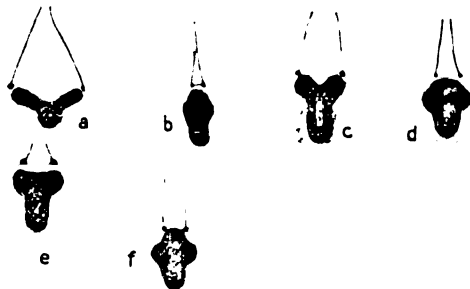
individuals have not separated (Fig. 9). A reference to the Text figs. 3 and 4 will provide an explanation of the various stages in the division of the kintonucleus. The karyosome elongates in a direction at right angles to the long axis of the kintonucleus, it becomes constricted and finally divided into two parts. Whether there is within the karyosome a centriole I have been unable to determine. The karyosome retains the stain so intensely that it is impossible to see within it. The dividing karyosome may be much



Text figure III.

Dividing kintonuclei of *Herpetomonas muscae domesticae* as seen after fixation in HERMANN'S fluid.

drawn out and the two halves remain connected by what may be a centrodosome (Text fig. 3d). Probably if the flagellate was broader than it is the centrodosome would be longer, as I have shown to be the case in some of the broad flagellates from the cultures of *Leishmania tropica* (32). When completely divided the two daughter karyosomes move towards the anterior end of the kintonucleus (Text figs. 4 a, c, e) and at the same time they separate seemingly under the influence of the basal granules which appear to



Text figure IV.

Dividing kintonuclei of *Herpetomonas muscae domesticae* as seen after fixation in SCHAUDINN'S sublimate alcohol mixture.

to lead the way. The anterior end of the nuclear membrane is stretched and finally a longitudinal splitting commences. In this manner there is produced a characteristic Y-shaped structure which stands out very clearly in the sublimate preparations owing to the whole kintonucleus staining deeply as already explained (Text fig. 4). The limbs of the Y become longer through further splitting till finally two kintonuclei result (Fig. 9). In this division of the kintonucleus the

basal granules appear to be exerting a direct traction upon the kinetonucleus which can be looked upon as being torn into two parts under their influence since the splitting commences at the anterior end of the kinetonucleus between the two basal granules. Frequently before the kinetonucleus has divided completely the daughter karyosomes themselves commence to divide again (Text fig. 3 e and f). In such cases, as far as I can make out from the preparations, the basal granules of the flagella are still single so that it would appear that the initiative in kinetonuclear division is taken by the karyosome; a fact which would speak strongly in favour of there being a centriole within the karyosome. This point however is exceedingly difficult to decide for the basal granules are so minute that the earliest stages of their division are hardly to be detected with the microscope.

Basal Granule. In close connection with the kinetonucleus is the basal granule from which the flagellum arises. In the flagellates fixed in HERMANN'S fluid the basal granule or granules lie upon the nuclear membrane and are probably attached to it (Figs. 12—15 and Textfig. 3). In the shrinking process produced by the sublimate fixation the basal granules remain attached to the flagellum and are torn from the nuclear membrane from which they eventually appear separated by the clear space already described (Textfig. 4, figs. 1—10). In the majority of specimens the granule is double for like the karyosome it divides very early in preparation for a coming division of the flagellate. It does not stain intensely and, as already explained, functions as a centrosome in nuclear division. In its division it elongates transversely and the separating halves remain connected by what may be looked upon as a centrodosome (Figs. 2, 4, 5).

It has been impossible to determine with any degree of accuracy whether the division of the basal granule is or is not the earliest sign of division of the kinetonucleus. The karyosome of the kinetonucleus is a deeply staining body and the first signs of its division is an elongation in the transverse diameter. Whether this is preceded by a division of a centriole within the karyosome I have also failed to determine nor have I seen any appearances which could be interpreted safely as a fibre connecting the basal granule of the flagellum with such an intrakaryosomic centriole. Apart from the possible formation of a centrodosome in the division of the karyosome of the kinetonucleus, there is no evidence that such a centriole exists and it must be admitted that evidence of this nature is

hardly sufficient. The basal granule functions as a centrosome and whether it is necessary to assume a second centrosomic granule within the karyosome is further discussed below.

Flagellum. The flagellum or strictly speaking the internal axis of the flagellum, arises from the basal granule and runs a straight course through the body of the flagellate to its anterior end when it becomes free. At the point of exit it receives a covering of the superficial ectoplasmic layer, the periplast, and this is continued along its whole length. When the basal granule divides, and most frequently before separation of the two halves is complete, a new rhizoplast commences to grow out parallel to the one already existing. It increases in length and when it reaches the anterior end of the body it passes into the ectoplasmic sheath of the old flagellum. In this way it is bound very closely to the old flagellum, so much so that an appearance of longitudinal splitting may be given. This is all the more marked in those cases where the tapering end of the new flagellum under- or over-lies the old flagellum and appears to unite with it. In every case however where the new flagellum is decidedly shorter than the old one there is a difference in their thickness for the new flagellum is at first very fine but increases in thickness with its increasing length. This in itself is incompatible with the view that the flagellum divides by longitudinal splitting. Moreover I believe that not only in *Herpetomonas muscae domesticae* but also in trypanosomes and other allied flagellates the new flagella are formed, not by division of the one already existing, but by an outgrowth from the divided basal granule.

When the new and old flagella are of equal length or even before this the body of the flagellate commences to split from its anterior end. At the same time the ectoplasmic sheath enclosing the two flagella also begins to divide at the base of the flagella so that one frequently sees partly divided flagellates in which the proximal part of the flagellar sheath has split while the distal part is still undivided (Fig. 9).

The axostyle or doppelfaden. There has been described by PROWAZEK and others a continuation of the flagellum posteriorly into the body of the flagellate behind the kinetonucleus. This is usually in the form of a double thread. I have searched my preparations for such structures but can find nothing so definite as that described by PROWAZEK. However in certain preparations some indication of longitudinally arranged fibres can be made out (Fig. 13). They appear to be quite irregular in structure and more like a longi-

tudinal arrangement of the protoplasmic alveoli than definite fibres. They do not appear so regularly in the sublimate fixed specimens. When present the two fibres commence in the neighbourhood of the kinetonucleus but I was quite unable to make out any connection between them and the flagella. They were only present in a small percentage of individuals so that they may be structures which are developed only at certain stages of development. A somewhat curious feature was that those flagellates which showed what appeared to be the best fixation after sublimate did not have these structures; on the other hand they appeared commonly in forms which had dried at the edge of the film before it could be brought into the fixing fluid. In most cases in which observers have described these fibres it has been from dried specimens stained by some form of ROMANOWSKY stain. It is possible that they are produced by some shrinking of the endoplasm, perhaps along the tract continuous with the base of the cytopharynx. In *Herpetomonas muscae domesticae* and *Herpetomonas jaculum* LÉGER (15) has described a canal running the whole length of the body of the flagellates. PORTER (21) has described longitudinal striae in *Herpetomonas jaculum* and MACKINNON (16) a pale tract extending the whole length of the body of *Herpetomonas muscae domesticae*. CHATTON and LÉGER (9) claim that the canal, double thread, etc. represent different views of one and the same structure. Very probably this is the correct view, and it may be that the double thread represents merely the two sides of this canal which have stained more deeply than the rest of the endoplasm. I would feel inclined to suggest that a liquid tract of endoplasm is in continuation with the cytostome I have described above, and that it functions as an intestinal canal along which the ingested bacteria pass to the posterior end of the body. CHATTON and LÉGER however do not regard the structure as a canal but trace its origin to a persisting centrodesmose formed when the kinetonucleus divides. ALEXEIEFF also regards it as an undivided centrodesmose and terms it an axostyle. I can find nothing to support this view. Further ALEXEIEFF (2) has used this axostyle in order to explain the occurrence of the flagellates of the trypanosome type (*Rhynchoidomonas* forms of PATTON) referred to above. He supposes that the trypanosome structure is produced not by a change in the relative position of the nuclei but by a loss of the true flagellum and the increased development of the axostyle which simulates the flagellum of the trypanosome. The idea is an ingenious one, but the figures he gives are hardly convincing. As I have already ex-

plained above it is evident, beyond any manner of doubt, that the trypanosome and leptomonas types result the one from the other by a true migration of the nuclei. The kinetonucleus does actually travel backwards in the body of the flagellate. It draws the flagellum in with it till the whole of it lies within or possibly on the surface of the body (see textfig. I). There is no indication whatever that the flagellum of the leptomonas forms is lost. The trypanosome forms arising in this way are exactly homologous with the true trypanosomes, and the transformation of the one type into the other takes place in the same manner as the change from the leptomonas to the trypanosome type as seen in the case of *Trypanosoma lewisi* in the blood of the rat. It is evident that a paucity of material has led ALEXEIEFF into this misinterpretation. The trypanosome forms of *Herpetomonas muscae domesticae* have no true undulating membrane though the flagellum does actually travel backwards on the surface of the body. They may still be regarded as trypanosomes as commonly understood for amongst the trypanosomes there is every degree of development of the undulating membrane from the condition seen in *Trypanosoma granulorum* with its well developed membrane to that in *Trypanosoma nanum* where little true membrane is present.

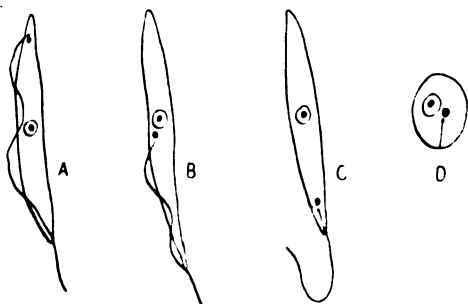
Nomenclature.

I do not intend to enter into a lengthy discussion of the vexed question of the correct nomenclature to be used in connection with the flagellate of the house fly. It has been clearly shown by HINDLE and MINCHIN that the first flagellate to receive the name *Leptomonas* was one from the gut of *Trilobus gracillis* a nematode worm. Till this flagellate is studied again and its life history is known it will be impossible to define this genus. We do know that in one stage at least it has an elongate body and a single terminal flagellum. In this respect it resembles the leptomonas forms of *Herpetomonas muscae domesticae* in one of its stages. The latter flagellate however may occur not only in the leptomonas form but also in crithidia, trypanosome, or leishmania stages. It thus corresponds to *Trypanosoma lewisi* which, in one stage or other of its development, may appear in any of these forms. Should therefore the house fly flagellate be included in the genus *Trypanosoma*? The fact that the house fly flagellate has no vertebrate host distinguishes it at once from *Trypanosoma lewisi* which should be regarded primarily as a flea flagellate which has become adapted to a temporary exist-

ence in the rat. This adaptation to an existence in the vertebrate has resulted in a further difference. *Herpetomonas muscae domesticae* and all flagellates peculiar to insects produce encysted forms which escape in the faeces and transmit the infection to a new host by way of the mouth. Such resistant cysts are not produced by *Trypanosoma lewisi* though the small unencysted trypanosomes voided by the flea in its faeces serve for the transmission of the infection to the rat by way of its mouth. In the case of other trypanosomes a further adaptation has taken place, for infection of the vertebrate is not produced by forms passed in the faeces, but by the injection of certain forms through the proboscis when the transmitting host feeds upon the vertebrate. It appears from the work of PATTON, PORTER, MACKINNON and others that some insect flagellates never have a trypanosome stage in their developmental cycle so that they differ in this respect from *Herpetomonas muscae domesticae*. Some of these seem to reach their highest development when they have attained the leptomonas type. They apparently never pass beyond this towards a crithidia type though they do become rounded or leishmania-like and eventually encyst. Similarly other insect flagellates reach a higher type and occur as crithidia with short undulating membrane. They however become transformed into leishmania forms through an intermediate stage which is essentially a leptomonas. Finally the highest development in the insect is reached by the flagellate of the house fly which may actually have the true trypanosome structure. It is possible that many forms which are not known to pass beyond the leptomonas stage may with further study be found to do so exceptionally, for it is only occasionally that the house fly flagellate occurs as a trypanosome. On this basis it is possible to draw up a scheme of classification for these flagellates which, if it has nothing else to recommend it, is at any rate convenient. Diagrammatically there are the following four types which these flagellates may assume (Text fig. 5. a, b, c and d).

In *Herpetomonas muscae domesticae* all four types occur and as the flagellate of the house fly is the type species of the genus then only those flagellates having all these stages are to be included in the genus. If however the flagellate, in addition to having all these stages in its true invertebrate host, has become adapted to a mode of life as a trypanosome in a vertebrate (eg. *Trypanosoma lewisi*) then it is to be regarded, not as a *Herpetomonas*, but as a *Trypanosoma*. A flagellate like the *Chrithidia pulicis* described by PORTER (22) from the human flea *Pulex irritans* has only the stages

b, c, and d; hence it is to be regarded as a *Crithidia* while such a flagellate as that described by FANTHAM (12) from the human body louse *Pediculus vestimenti* having only forms c and d must be included in another genus. It cannot be included in the genus *Herpetomonas*



Text figure V.

Diagram of Types of Flagellate.

A Trypanosome. B Crithidia. C Leptomonas.

D. Leishmania.

(Throughout this paper the flagellates of type C have been spoken of as leptomonas. — In the literature on the subject they are frequently described as herpetomonas forms without any reference to any particular genus.)

along with the flagellate of the house fly since it has, as far as we know at present, no trypanosome stage, nor in the genus *Crithidia* as it has no crithidia stage. The most convenient name to use would be *Leptomonas* employed first for the flagellate of *Trilobus gracilis*. The entire life history of this flagellate is not known but we do know that it has the leptomonas structure at one stage at least. Further study may reveal as many

stages as occur in the case of the house fly flagellate. If this should prove to be the case then the name *Leptomonas* would take precedence over the name *Herpetomonas*, and the house fly flagellate would become *Leptomonas muscae domesticae*. Meanwhile, however, it will be well, in order to avoid the creation of new names, to retain the name *Leptomonas* for those flagellates of invertebrates which have only the stages c and d of Text fig. 5. We know no flagellate of insects which remains always as a leishmania. If one should be discovered then a new genus would have to be created for its reception. There remain for consideration the parasites causing the diseases of man known as Kala-azar and Oriental Sore. These organisms agree with the *Leptomonas* in showing only stages c and d but just as the genus *Trypanosoma* differs from *Herpetomonas* in having a vertebrate host so the parasites of these diseases differ from *Leptomonas*. Hence the genus *Leishmania* includes flagellates having stages c and d but which have both a vertebrate and an invertebrate host. This scheme of classification is inconvenient in that it entails a complete knowledge of the life history of any individual before its exact position can be determined. It is, however, a natural one if we regard the

trypanosome as the highest stage of development to which an original *Leptomonas* has attained. I do not agree with PATTON, ALEXEIEFF, and others who think that the parasites of Kala-azar and Oriental Sore should be included in the genus *Herpetomonas* or *Leptomonas* which are used for true insect flagellates having no developmental stage in a vertebrate. Apart from the fundamental difference that the *Leishmania* can live and produce disease in man and other vertebrates a further difference will probably be found to be associated with this mode of life. Just as *Trypanosoma lewisi* no longer produces resistant cysts for transmission while the flagellates peculiar to the fleas still do so, so, in all probability, *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica* will be found to have lost the encysted stage which is still retained by the true *Herpetomonas* and *Leptomonas*.

Schematically the classification can be represented as in the accompanying diagram.

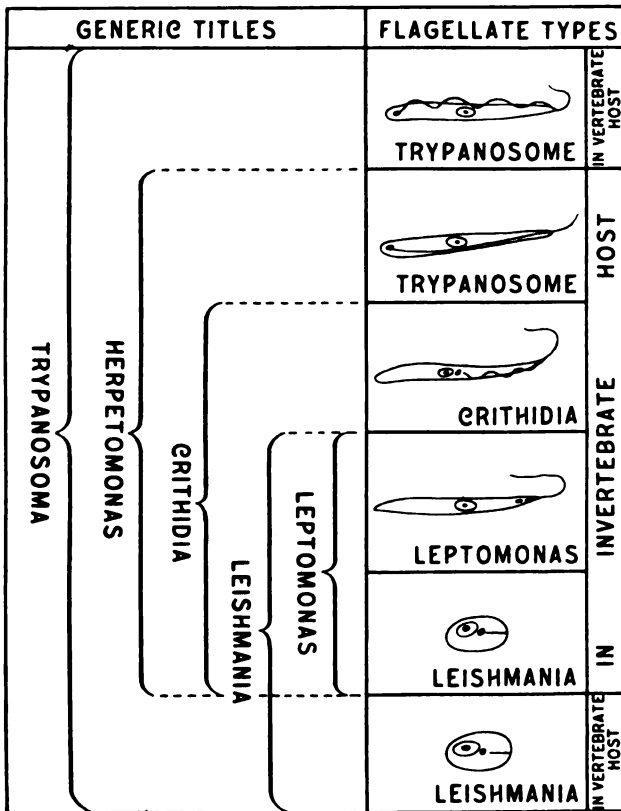


Diagram of classification of the trypanosomes and allied flagellates.

The nuclear structure of some allied flagellates.

Having described the nuclear structure and flagellar apparatus of *Herpetomonas muscae domesticae* I will now describe the results obtained from the examination of some allied flagellates. The flagellate of the house fly is comparatively large, and what is more important, has a large kintonucleus which enables one to make out details more clearly than in some of the allied organisms. I believe that all the flagellates belonging to the various genera described in the last section have the same type of nucleus as *Herpetomonas muscae domesticae*. ROSENBUSCH (36) has expressed a similar view and has stated that the trophonucleus and kintonucleus were both true nuclei built up on a common plan and that in reproduction they divided in a similar manner. The true nuclear nature of what is now known as the kintonucleus was enunciated by SCHAUDINN and this conception has become the basis of the Binucleata group of HARTMANN and JOLLOS, PROWAZEK and others. In his recently published treatise on Protozoology MINCHIN (18) has expressed the same view. In order to arrive at some definite idea as to whether the nuclei of trypanosomes and allied flagellates were constructed after the plan of those of *Herpetomonas muscae domesticae* I have examined the following flagellates *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma lewisi*, *Leishmania tropica* from South America in cultural form, and a *Leptomonas* obtained in culture from the gut of the human flea *Pulex irritans*.

Trypanosoma rhodesiense. The material used was obtained from the blood of rats infected in the first place by inoculation from man. Observations upon this trypanosome, as indeed upon all the pathogenic trypanosomes, are most difficult to make on account of the small size of the nuclei. In the case of *Trypanosoma rhodesiense*, as it appears in the rat, certain trypanosomes known as "posterior nuclear forms" on account of the posterior position of the trophonucleus, have this latter structure comparatively large and conspicuous. When this nucleus divides it behaves as the nucleus of *Herpetomonas muscae domesticae* (Figs. 32 a—h). Within the large karyosome, in favourably stained specimens, one can distinguish a granule which undoubtedly represents the centriole, or this structure together with a certain amount of chromatin. In division the centriole divides and there is produced a centrodosome. The karyosome may divide as the daughter centrioles separate (Fig. 32 h) or the separating daughter centrioles move out of the karyosome which

comes to lie at the centre of the centrodesmose (Fig. 32 a). I was not able to distinguish any structures which could be interpreted without doubt as chromosomes. ROSENBUSCH (26) has figured these in connection with nuclear division in *Trypanosoma equinum* and CHAGAS in *Schizotrypanum cruzi* but in the case of *Trypanosoma rhodesiense* I could not convince myself that chromosomes were a regular feature of nuclear division any more than they were in the case of *Herpetomonas muscae domesticae*. Certain structures occur which could be depicted and interpreted as such, but this is quite exceptional and they are so small that it is impossible to be microscopically certain of them. In the case of the kinetonucleus observations are even more difficult to make. So much depends upon the exact degree of differentiation that the majority of trypanosomes fail to show very much. However I believe that enough can be made out to show that the kinetonucleus is a true nucleus consisting of a nuclear membrane enclosing a space within which lies the usual karyosome. The latter structure is most usually situated on the posterior part of the nuclear membrane while on the anterior part, opposite the karyosome lies the basal granule of the flagellum or two of these when division has taken place (Fig. 31). It is impossible to make out more than this from the preparations except that when the karyosome divides it becomes constricted at its centre, and drawn out slightly, so that one may conjecture, if one wishes, that within it, is a dividing centriole giving rise to a short centrodesmose. In the case of *Trypanosoma equinum* ROSENBUSCH (26) has figured what he supposes to be a mitotic division of the kinetonucleus. It is quite possible to pick out from preparations isolated instances of nuclear division which can be interpreted by the desiring mind as stages in a mitosis. The fact that in some of ROSENBUSCH's figures the axis of his supposed spindle is at right angles to the direction in which the kinetonucleus usually divides is certainly an argument against his view. In dealing with such extremely minute objects which are reaching the limits of accurate microscopical observation something more than the finding of isolated instances of what may be interpreted as mitotic figures, is required before one assumes that such a mode of nuclear division occurs. In the case of the dividing kinetonucleus of trypanosomes it is certain that very few indeed show any indication of a possible mitotic division, and when a possible mitotic stage is found it must not be hastily assumed that it is such. If mitotic figures occurred in nearly every dividing trypanosome it would be a different matter,

but, it seems to me, that there is a tendency for some observers to interpret certain appearances, which may be quite accidental, as stages in mitotic division. Such a theoretical bias is bound to be most misleading, especially when such deductions are used as a foundation for further theorising. That the description I have given above represents the true structure of the kintonucleus is borne out by certain appearances I have noted in degenerating trypanosomes. I have often been impressed by the fact that when an animal dies with a very large infection of some pathogenic trypanosome, smears made from its organs may show numbers of degenerating trypanosomes. It is easy in a smear stained by ROMANOWSKY stain to trace every stage of this degeneration. The cytoplasm degenerates and breaks away till the trophonucleus and kintonucleus are liberated. In nearly every instance in which this occurs the flagellum with its basal granule remains attached to the kintonucleus. This cannot be an artificial connection the result of the drying process. It must mean that in the living trypanosome the flagellum is attached to the kintonucleus. Further a careful examination of many of the specimens shows that the basal granule is lying on the surface of a nuclear membrane within which is to be seen the deeply staining karyosome. These forms have been illustrated at figs. 28—30 and 33—36.

Another feature brought out in these degeneration products of the trypanosomes is the structure of the flagellum. It will be seen (Figs. 29, 33, 35) that the first part of the flagellum corresponding to the rhizoplast or intra-cytoplasmic portion of the flagellum is much finer than the rest. This is probably due to the fact that the flagellum when it passes along the undulating membrane is clothed in an envelope of periplast just as in the case of the flagellum of *Herpetomonas muscae domesticae* described above. In division of the trypanosomes the new flagellum is formed by a fibre growing out from the divided basal granule. When this fibre reaches the surface of the body it passes into the periplast sheath of the old flagellum. When the new flagellum has reached a certain degree of development the sheath splits between the two flagella, as also does the undulating membrane and this division proceeds from behind forwards in such a manner that the duplication of the membrane is always a little behind the termination of the outgrowing new flagellum. This mode of formation of the new flagellum and undulating membrane occurs in all those trypanosomes I have examined and I believe it will be found that in all flagellates of this type the new flagellum



VERLAG von GUSTAV FISCHER in JENA

Vorträge über DESCENDENZTHEORIE

gehalten an der Universität zu
Freiburg im Breisgau

von

AUGUST WEISMANN.

Dritte umgearbeitete Auflage.

Mit 3 farbigen Tafeln und 137 Textfiguren. 1913.

Um die Verbreitung des Buches in weiteren Kreisen zu erleichtern, ist der Preis auf nur 11 Mark für das broschiierte und 13 Mark für das gebundene Exemplar angesetzt worden.

„Wenn ein Naturforscher von der Bedeutung WEISMANNs, der während eines langen Lebens über die tiefsten Probleme der Biologie geforscht, gedacht und geschrieben hat, ein umfangreiches Werk über die Abstammungslehre erscheinen läßt, so sollte dies nicht nur die Fachgelehrten angehen, sondern es sollte ein Ereignis für die ganze gebildete Welt sein.“ So sagte die Frankfurter Zeitung in einer Besprechung vom 16. Oktober 1902.



Fig. 5. Falter des Abend-Pfauenäuges in Trutzstellung.

Eine wahrhaft bedeutungsvolle Erscheinung auf naturwissenschaftlichem Gebiet also ist das, eine Schrift, die in gedrängter Form die

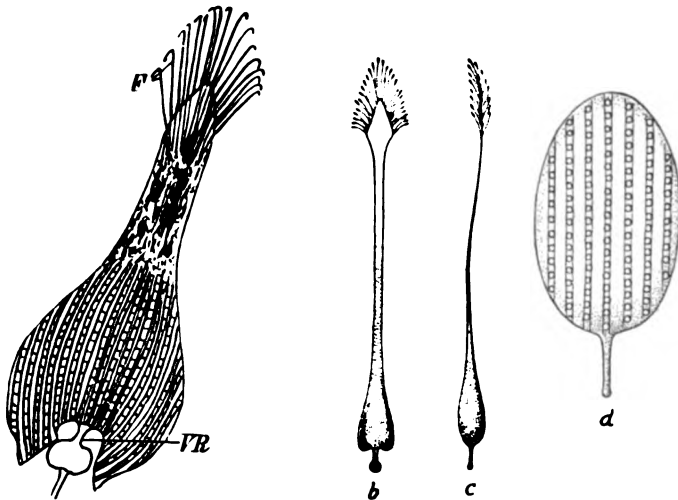


Fig. 53. Duftschuppen von Tagfaltern. *a* von *Pieris*, *b* von *Argynnis Paphia*, *c* von einer *Satyride*, *d* von *Lycaena*; starke Vergrößerung.

Lebensarbeit eines der größten lebenden deutschen Biologen einem weiteren Leserkreise vermittelt.

Fig. 69.

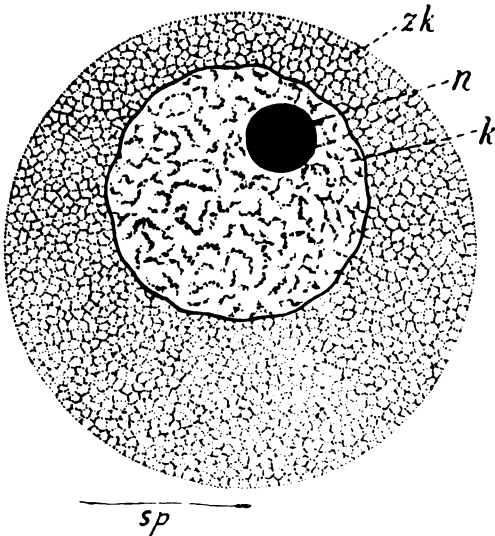


Fig. 70.

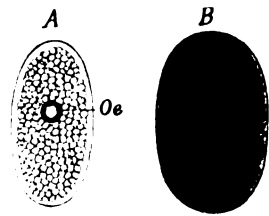


Fig. 69 Eizelle vom Seeigel, *Toxopneustes lividus* nach WILSON. *zk* Zellkörper, *k* Kern (sog. Keimbläschen), *n* Kernkörperchen (sog. Keimfleck, darunter: ein Spermatozoon (*sp*)) desselben Tieres bei derselben Vergrößerung (750).

Fig. 70. *Daphnella*, *A* Sommerci, *B* Winterci, *Oe* „Öltropfen“ des Sommerci.

Ein Buch zum Lesen ist es, nicht ein solches zum Nachschlagen, und zwar ein Buch „für jedermann, dem es interessiert“. In

der Darstellung sind möglichst wenig Spezialkenntnisse vorausgesetzt, so daß jeder, der das Buch nicht bloß durchblättert, sondern liest, sich auch in die schwierigeren Fragen seiner späteren Vorträge ohne Mühe hineinlesen wird.

In seinem Vorwort zu der neuen Auflage führt Exz. WEISMANN u. a. das folgende aus: „Seit dem Erscheinen der zweiten Auflage sind 9 Jahre verflossen, ein langer Zeitraum, wenn man weiß, daß gerade

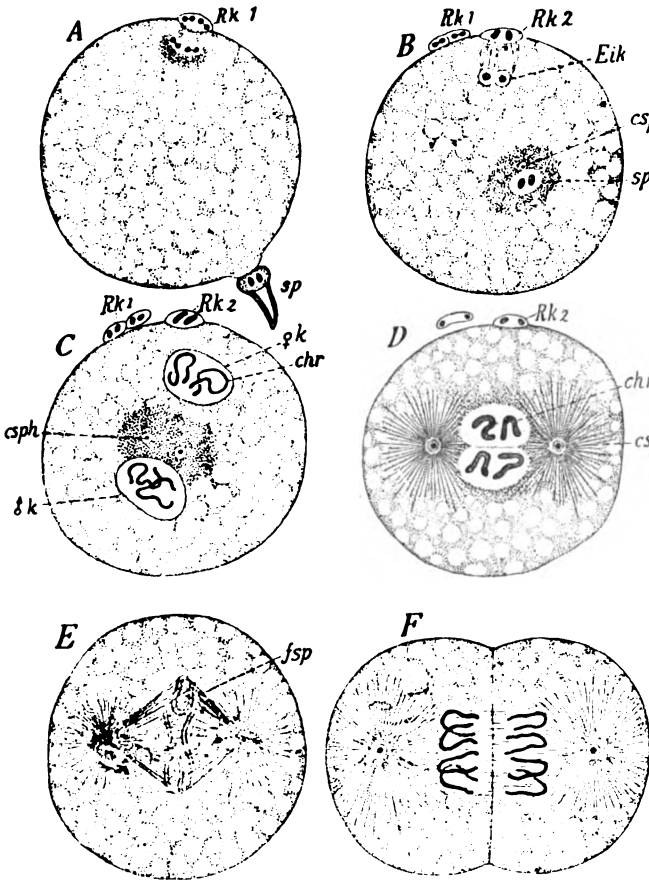


Fig. 75. Befruchtungsvorgang bei *Ascaris megalocephala*, dem Pferdespulwurm, frei nach BOVERI und VAN BENEDEN. *A* Ei in der ersten Richtungs- teilung begriffen; *Rk1* erster Richtungskörper; *sp* Samenzelle mit zwei Chromosomen im Kern; auf dem Ei festhaftend und im Begriff einzudringen; eine hügelige Erhebung des Eiprotoplasmas kommt ihr entgegen. — *B* Die zweite Richtungs- teilung ist vollendet; *Rk2* das zweite Richtungs- körperchen, *Eik* der Eikern. Das erste Richtungskörperchen (*Rk1*) in zwei Tochter- zellen geteilt; *spk* der von der Samenzelle allein noch sichtbare Kern nebst seiner Centrosphäre (*csph*). — *C* Spermakern (*sk*) und Eikern (*k*) ge- wachsen, je zwei schleifenförmige Chromosomen in jedem; nur der männliche Kern besitzt eine Centro- sphäre, die sich bereits

in zwei geteilt hat (*csph*). — *D* Die beiden Kerne liegen aneinander zwischen den Polen der Kernspindel. — *E* Die vier Chromosomen der Länge nach gespalten, die Spindel zur ersten Teilung des Eies (Furchungsspindel *fsp*) ist gebildet. — *F* Auseinanderrücken der Tochterchromosomen; Teilung der Zellen in die zwei ersten Furchungs-(Embryonal-)Zellen.

in diesen Jahren eine immer wachsende Zahl vorzüglicher biologischer Arbeiter rastlos tätig gewesen ist, unser Wissen zu erweitern, ganz besonders auf dem Gebiet der Vererbungslehre und den mit ihr zusammenhängenden Gebieten der Forschung. Einerseits sind es die Vererbungserscheinungen selbst, welche seit den genialen Entdeckungen MENDELS immer umfassender durchgearbeitet wurden und immer stärker

in ihrer Bedeutung hervortraten, andererseits die Grundlagen dieser Erscheinungen im Keimplasma, die wunderbar verwickelten Verhältnisse der Keimsubstanz, des Idioplasmas, welche immer klarer und vollständiger heraustraten und zu ungeahnten neuen Auffassungen führen.

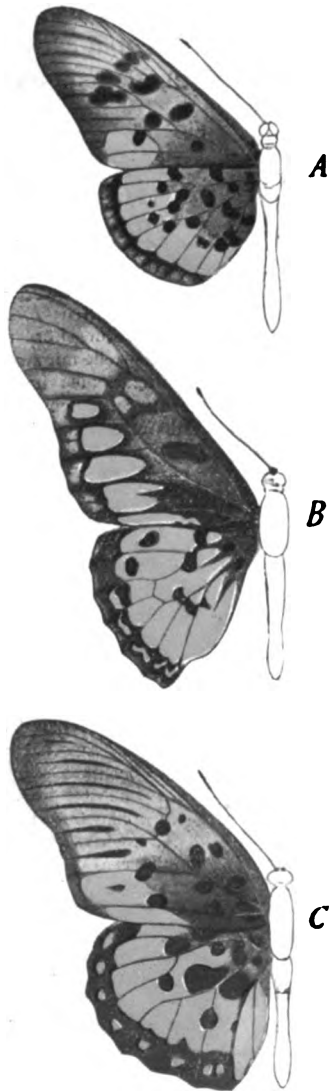


Fig. 18. Oberseiten von *A*, *Acraea Egina* von der Goldküste, immun; *B*, *Papilio Ridleyanus* aus Gabun, nicht immun; *C*, *Pseudacraea Boisduvalii* von der Goldküste, nicht immun.

Derartige tiefgreifende Ergebnisse mußten natürlich, soweit sie sicher waren, in diese Auflage mit hereingenommen und die daraus sich ergebenden Schlüsse gezogen werden. Daß nun trotzdem die früheren Grundanschauungen vom Leben und von der Vererbung und Entwicklung, wie sie in den ersten Auflagen schon enthalten waren, nicht wesentlich verändert zu werden brauchten, darf wohl als ein Zeichen ihrer Brauchbarkeit gelten. Sowohl die allgemeine Vorstellung von einem „Keimplasma“ als die Zusammensetzung desselben aus geordneten Scharen von materiellen Anlagen konnte beibehalten werden und ebenso die Anschauung von einer Germinalselektion als Grundlage aller dauernden Veränderungen des Organismus und somit der Artumwandlungen.

Ich sollte meinen, daß darin die zuversichtliche Hoffnung auf weitere Lebensfähigkeit dieser Vorstellungen gesehen werden dürfte, als eines Fundamentes, auf welchem die Wissenschaft weiterbauen kann. Damit soll nicht gesagt sein, daß wir hier schon am Ende der uns möglichen Erkenntnis ständen. Wir sehen im Gegenteil jetzt schon wieder Lücken in dem uns vorliegenden Tatsachenmaterial, deren der einstige Ausfüllung sehr wohl auch Änderungen in unseren Vorstellungen allgemeinerer Art nach sich ziehen kann. Aber wir stehen in den Hauptsachen doch wohl auf festem Boden und brauchen nicht zu fürchten, daß das bisher Errungene

später einmal wieder aufgegeben, gewissermaßen wieder von vorne angefangen werden müsse.

Die DARWINsche Selektionslehre wird niemals wieder aufgegeben werden. Wer an ihr noch zweifelt, der braucht nur die in diesem Buch gegebene Darstellung der Erscheinungen der Mimicry zu lesen und durchzudenken. So bestimmte und zahlreiche Tatsachen bilden allein schon einen unwiderleglichen Beweis für dieselbe, auch wenn wir keinen anderen hätten. Von ihr aber ist Germinalselektion nur eine Konsequenz, welche mit ihr zusammenarbeitet und ohne die wir den Anpassungen gegenüber hilflos dastehen würden.



Fig. 55. *Zeuxidia Wallacei*. Männchen, vier Pinsel von langen, borstenartigen, stark gelben Duftschuppen (*d*) auf der Oberseite des Hinterflügels.

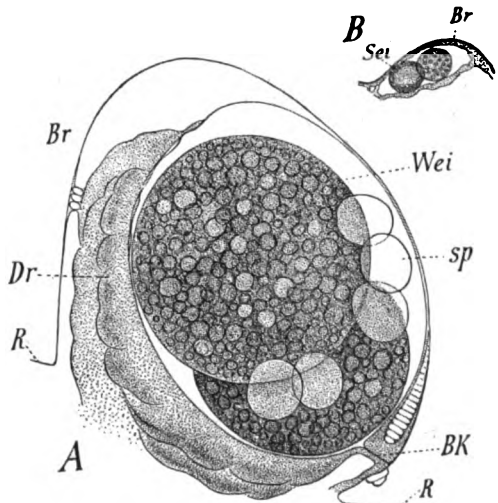


Fig. 71. *Bythotrephes longimanus*; der Brut-sack (*Br*) des Weibchens. *A* mit zwei Wintereiern gefüllt (*Wei*), auf denen fünf große Samenzellen (*sp*) liegen, *R* Rücken des Tieres, *Dr* Drüsensicht zur Absonderung der Schalensubstanz, *Bk* Begattungs-kanal. — *B* Brut-sack (*Br*) mit zwei Sommereiern gefüllt (*Set*); bei derselben Vergrößerung (100) gezeichnet.

Am ersten Teil des Buches brauchte nur wenig verändert oder zugesetzt zu werden, zum zweiten aber mußte ein ganzer Vortrag neu hinzugefügt und manche kleinere Veränderungen vorgenommen werden, um alle Teile in Harmonie mit dem neu Eingefügten zu setzen.

Bei der Entwicklung neuer Tatsachen und Auffassungen habe ich mich bemüht, nur das Wesentliche zu geben, dieses aber in genügender Ausführlichkeit. Es versteht sich, daß dabei von Vollständigkeit abgesehen werden mußte und nicht nur darum, weil Vieles noch schwankend und unsicher ist und deshalb genauestes Eingehen erfordern würde, wenn überhaupt davon gesprochen werden sollte.“

Inhaltsübersicht.

Allgemeine und historische Einleitung.
 Das Prinzip der Naturzüchtung.
 Die Färbungen der Tiere und ihre Beziehung auf Selektionsvorgänge.
 Eigentliche Mimicry.
 Schutzvorrichtungen bei Pflanzen.
 Fleischfressende Pflanzen.
 Die Instinkte der Tiere.
 Lebensgemeinschaften oder Symbiosen.
 Die Entstehung der Blumen.
 Sexuelle Selektion.
 Intraelektion oder Histonalektion.
 Die Fortpflanzung der Einzelligen.
 Die Fortpflanzung durch Keimzellen.
 Der Befruchtungsvorgang.
 Der Befruchtungsvorgang bei Pflanzen und Einzelligen.
 Die Keimplasmatheorie.

Regeneration.
 Vererbungserscheinungen im engeren Sinne.
 Anteil der Eltern am Aufbau des Kindes; Rückschlag.
 Prüfung der Hypothese einer Vererbung funktioneller Abänderungen.
 Einwürfe gegen die Nichtvererbung funktioneller Abänderungen.
 Germinalektion.
 Biogenetisches Gesetz.
 Allgemeine Bedeutung der Amphimixis.
 Inzucht, Parthenogenese, asexuelle Vermehrung und ihre Folgen.
 Veränderungen durch Medium-Einflüsse.
 Einfluß der Isolierung auf die Artbildung.
 Entstehung des Artbildes.
 Artenentstehung und Artentod.
 Urzeugung und Entwicklung. — Schluß.

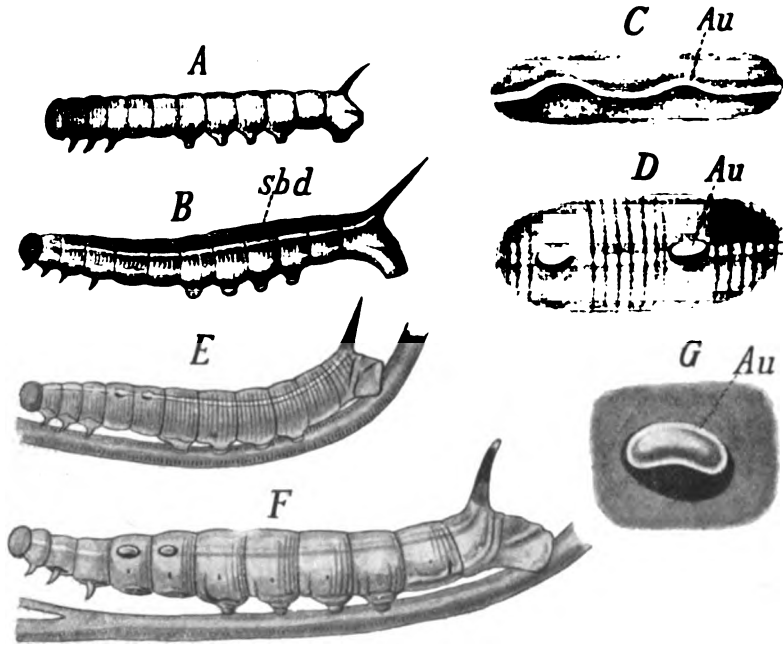


Fig. 122. Entwicklung der Augenflecken bei der Raupe von *Chaerocampa Elpenor*, dem Weinschwärmer. *A* Stadium I noch ohne Zeichnung, einfach grün. *B* Stadium II mit Subdorsalstreifen (*sbd*). *C* Subdorsallinie etwas später mit erster Anlage der Augenflecke (*Au*) auf Segment 4 und 5. *D* Augenflecke auf Stadium III der Raupe, etwas weiter entwickelt als in *E*, dem dritten Raupenstadium. *F* Stadium IV der Raupe. *G* der vordere Augenfleck auf demselben Stadium.

Bei Bestellungen des Buches bitte ich den beigegebenen Bestellzettel zu benutzen und diesen ausgefüllt derjenigen Buchhandlung zu übergeben, durch welche die Zusendung gewünscht wird.

Aus den Stimmen der Presse:

Naturwissenschaftliche Wochenschrift:

Diese Vorträge werden nicht verfehlen, bei allen Biologen, mögen sie über Vererbungsfragen denken wie sie wollen, das weitgehendste Interesse wachzurufen.

Anatomischer Anzeiger, Nr. 18/19, vom 11. August 1902:

Das Werk soll und muß gelesen und studiert werden. Es wird jedenfalls einen Abschnitt in der Geschichte der Descendenztheorie bezeichnen.

Die Ausstattung ist ausgezeichnet, die Tafeln (Mimicry, Schmetterlinge) sind in der Farbengebung geradezu entzückend. Der Preis ist dabei überaus niedrig.

Die Umschau, Nr. 49, vom 22. November 1902:

Auch der größte Gegner Weismanns muß von Bewunderung für diesen Mann erfüllt werden, wenn er die „Vorträge“ studiert.

Münchener Mediz. Wochenschrift, Nr. 11, vom 17. März 1903:

Die flotte, anregende Art der Darstellung läßt selbst da, wo die Gedankengänge des Verfassers etwas schwierig sind, das Studium des Werkes noch zu einem wirklichen Genuß werden.

Über die zweite Auflage sagt die Frankfurter Zeitung:

Die zweite Auflage enthält gegenüber der ersten viele Verbesserungen und Zusätze. Nicht unerwähnt möge bleiben, daß der Verlag den Preis auf die Hälfte herabgesetzt hat: **das Buch ist dadurch, wenn man Umfang und Ausstattung berücksichtigt, wohl eines der billigsten Bücher geworden, die es gibt.** Bei seinem ersten Erscheinen ist das Werk, das die Lebensarbeit des betagten Forschers zusammenfaßt, hier eingehend gewürdigt worden. **Möge es die Verbreitung finden, die es um seiner Vorzüge und um seiner Bedeutung willen verdient!**

Bücherzettel

An

in.....

Jahresbericht über die Fortschritte und Leistungen auf dem Gebiete der Sozialen Hygiene und Demographie, Bd. II:

Das Weismannsche Buch gehört zu den Standardwerken der Kulturwelt, welche dazu bestimmt sind, eine tiefe und anhaltende Wirkung auf die Geistesentwicklung auszuüben.

Deutsche Rundschau, Heft 8, vom Mai 1903:

Es ist ein Werk von solcher stilistischer Klarheit, wie der Darwinismus höchstens noch zwei oder drei besitzt unter seinen allerbesten. Es ist alles so abgeschliffen und ausgeklärt, jedes Beispiel genau blankgewischt und an seinen Fleck gestellt, wie bei Schauobjekten einer am Schnürchen laufenden Schuldemonstration. Sehen muß hier jeder, was gemeint ist.

Allgemeine Zeitschrift für Entomologie, Nr. 14/15, vom 1. August 1902:

So bietet das Weismannsche Werk eine reiche Fülle von Anregung jeder Art, die sich nicht nur jeder Zoologe, sondern auch jeder Entomologe zu Nutze machen sollte.

Naturwissenschaftliche Rundschau, 1902:

Seit vielen Jahren gehört Weismanns Collog über die Descendenzlehre zu den beliebtesten Vorlesungen an der Universität Freiburg, und es ist sehr erfreulich, daß Professor Weismann den Inhalt desselben durch das vorliegende Buch auch weiteren Kreisen zugänglich gemacht hat. Aber der wissenschaftliche Wert des Buches liegt nicht allein darin, daß dasselbe eine überaus klare und anziehende Darstellung der Hauptlehren der Descendenztheorie enthält, sondern das Werk gewinnt noch eine besondere Bedeutung, insofern es eine einheitliche Zusammenfassung der Weismannschen Vererbungstheorie bietet.

Wiener klinische Wochenschrift, Nr. 46, 1902:

Scharf umrissen und bestimmt hat Weismann hier seine Anschauungen über Werden und Vergehen der Lebewesen, über die geheimnisvollen Vorgänge der Fortpflanzung und Vererbung zusammengefaßt.

Die gewählte Vortragsform in Verbindung mit der fließenden, leichten Ausdrucksweise macht es auch einem dem Gebiete fernerstehenden Leser möglich, mit Genuß und Nutzen den Inhalt des Buches in sich aufzunehmen. Daher kann es auch jedem biologisch denkenden Arzte bestens empfohlen werden. Die Ausstattung ist vorzüglich, besonders die angefügten Farbentafeln sind meisterhaft wiedergegeben.

Bestellzettel.

An die Buchhandlung

.....
Aus dem Verlage von **Gustav Fischer** in **Jena** bestelle ich:

..... Expl. **WEISMANN, Vorträge über Descendenztheorie.**
Dritte umgearbeitete Auflage.

..... Preis: 11 Mark.
..... Expl. do. do. geb. Preis: 13 Mark.

Ort und Tag:

Name:

is an entirely new formation and not produced by splitting of the one already existing.

Trypanosoma lewisi. The structure of this common trypanosome of the rat has been so carefully described by MINCHIN (17) that it may seem superfluous to add any more. MINCHIN'S description referred only to *Trypanosoma lewisi* as seen in rats with the established infection. During the active multiplication stage, in the early days of an infection, there appear in the blood of the rat many large trypanosomes which are much more suitable for nuclear observation than the comparatively small forms to be met with when the infection is older. As regards the trophonucleus of these large trypanosomes I have nothing to add to the description of MINCHIN. There is a large karyosome surrounded by a clear area limited by a nuclear membrane. Certain fine granules may occupy the clear area between the karyosome and membrane (Fig. 27). In division of the nucleus the karyosome divides and as the two halves separate they may remain connected by a fine fibre which is undoubtedly a centrodesmose (Fig. 23). I have seen no evidence that a true mitosis with formation of chromosomes ever occurs in this division.

In describing certain stages of *Trypanosoma lewisi* seen by me in rats in the SUDAN I (31) wrote "it appears as if the micronucleus consists of two parts, a chromatic and an achromatic part. The whole micronucleus seems to be limited by a delicate membrane which stains as the chromatic portion. The flagellum springs from the outer surface of the achromatic hemisphere and is directly connected with the membrane limiting the micronucleus." This description was based upon dried specimens but in the larger trypanosomes practically the same structure can be made out in the wet fixed preparations. The kintonucleus of *Trypanosoma lewisi* corresponds with that of *Trypanosoma rhodesiense* described above. This can be understood by a reference to the figures of *Trypanosoma lewisi* in the plate (Figs. 23, 24, 27). It is most probable that the smaller trypanosomes seen in the older infections have kintonuclei of similar structure but that their minute size renders certainty on this point almost an impossibility. DOFLEIN (10) has figured kintonuclei of similar structure from cultural forms of the trypanosome of frogs and CHAGAS (6) from *Schizotrypanum cruzi*.

Leptomonas from Pulex irritans. Cultures of this flagellate were obtained by inoculating the faeces of the flea on to NNN. medium. On this medium the flagellate multiplied very rapidly so that many dividing forms could be studied. In the case of

the trophonucleus the dividing centriole produces a definite centrodesmose extending from one end of the elongated nuclear membrane to the other (Fig. 16, 18, 26). The karyosome remains as a deep staining mass at the centre of the centrodesmose. Eventually the karyosome divides into two parts which pass to opposite ends of the nucleus (Figs. 19, 20, 26 e, f, h). The kintonucleus stands out very clearly and in structure corresponds with the description given above for the other flagellates (Figs. 16—19).

Leishmania. In the flagellate forms developed in cultures of the *Leishmania tropica* from South American tropical sore of man, the nuclei are arranged on a plan similar to that just described for the flagellate of the flea. I have described in a earlier paper (33) the nuclear division of similar flagellates in cultures of *Leishmania tropica* from Bagdad sore. The division of the trophonucleus was described as taking place under the influence of centrioles which produced a centrodesmose between them. The further observations I have made show this to be correct. VISENTINI (30) has recently made similar and confirmatory observations upon the *Leishmania* of Mediterranean kala-azar. In the case of the kintonucleus I showed that the division took place with the production of a centrodesmose and concluded that in this case also a centriole existed as in the trophonucleus. I was unable however to make out clearly the termination of the flagellum which in many instances appeared to unite directly with the karyosome of the kintonucleus. VISENTINI (30) describes this as occurring occasionally in the flagellates developed in culture from the *Leishmania* of Mediterranean kala-azar. I now find from the examination of more material that the kintonucleus, as in the other flagellates considered above, consists of a nuclear membrane enclosing a clear space in which the karyosome lies usually against the posterior side of the membrane. The flagellum arises from a basal granule lying on the anterior part of the nuclear membrane (Fig. 21 and 25). VISENTINI, likewise agrees that the kintonucleus is constructed on the same plan as the trophonucleus and that the flagellar rhizoplast springs from a basal granule outside the karyosome. He speaks of this basal granule as lying in the clear space between the karyosome and nuclear membrane. I believe however that in most cases at any rate the basal granule is actually on the nuclear membrane and probably on its outer surface. In division the basal granule divides and a new rhizoplast grows out from the new granule into a new flagellum and I believe that VISENTINI is wrong when he speaks of the splitting of the flagellum

to produce one long flagellum and one short one, the latter growing out till it equals the other in length.

Cercomonas longicauda. I have described elsewhere (32), under the name of *Cercomonas longicauda*, a flagellate which was obtained in culture from a human intestine. This flagellate, or one which is indistinguishable from the one described by me, has been redescribed by HARTMANN and CHAGAS (14) under the name of *Cercomonas parva* also from the human intestine. The flagellate has a pear shaped body, possesses a nucleus and two flagella which arise from the blunt end of the body. One flagellum is directed forwards and by its lashing movements drags the creature through the liquid medium in which it lives, while the other passes over the surface of the body to which it is attached and becomes a tapering free flagellum at the tapering posterior end of the animal. There is no doubt as to this arrangement of the attached flagellum. Sometimes the line of attachment is raised into a slight ridge but there is never developed an undulating membrane comparable with that of such flagellates as *Trichomonas*. The single nucleus lies near the blunt end of the body and consists of a nuclear membrane enclosing a clear space at the centre of which lies the large karyosome. The nuclear membrane is drawn out towards the blunt end of the body into a cone, and from a granule or short rod at the apex of this cone spring the two flagella. Sometimes the apex of the cone reaches the surface of the body in which case the flagella spring directly from it without there being any rhizoplast; in other cases the nucleus lies more deeply so that before reaching the surface, the flagella run through the body for a short distance from the basal granule at the apex of the nucleus to the anterior end of the flagellate. The Text figure 6 below will show clearly the general structure of the flagellate. It may be that the apex of the nuclear cone always reaches the surface of the body and that it apparently does not do so in some cases owing to the position assumed by the flagellate on the slide. I have taken the trouble to again draw attention to the structure of this flagellate because HARTMANN and CHAGAS (14) in their description of *Cercomonas parva*, have given what is, in all probability, an erroneous account. The point of dispute is the second or attached flagellum. Instead of regarding it as passing over the surface of the body as described by me they suppose that it runs backwards through the body to the posterior tapering end and they further consider that both flagella arise from a centriole within the karyosome, the one flagellum running for-

wards to the apex of the nuclear cone and thence to the surface of the blunt end of the animal to become the free flagellum, while the other passes backwards to the posterior part of the nuclear membrane and then through the body to the tapering posterior extremity. This appearance could very easily be produced, as I can see from my preparations, by viewing the flagellate in such a position that the attached flagellum was running across the surface of the body over the karyosome which happened to be beneath it. This is frequently the case with my *Cercomonas longicauda*



Text figure VI.

Diagrammatic representation of the structure of *Cercomonas* to show how one flagellum passes over and is attached to the surface of the body. In certain positions of the flagellate this flagellum would lie over the karyosome of the nucleus when it might appear as if both flagella took origin in the karyosome.

and I believe that such is the explanation of the view of HARTMANN and CHAGAS on the structure of their *Cercomonas parva* (see their Figs. 1, 2 and 4). I have, as I have said in my previous paper, kept this flagellate under observation for a long time so that I am perfectly confident that my description is correct. I have further searched in vain through thousands of individuals for some indication of a fibre connecting the basal granule of the flagellum with a possible centriole within the karyosome, as described by HARTMANN and CHAGAS. The foregoing account of the flagellate refers to its appearance when it is living in a liquid medium. As I have previously described, and as HARTMANN and CHAGAS have found also, the flagellate will live and multiply very rapidly on the surface of an agar medium. Here it becomes amœboid and crawls over the surface of the agar with the result that the flagella are never so

long as they are in the forms swimming in the liquid medium, and further the second or attached flagellum becomes detached from the body and behaves as a free lashing flagellum like the other one. This could hardly be the case if the second flagellum was completely within the body as HARTMANN and CHAGAS maintain. Many of their figures show these forms but in order to explain the appearance of the two free flagella they assume that the single flagellum has split longitudinally into separate fibrils, and that it represents an approaching degeneration of the flagellum in preparation for a coming division of the nucleus, for they believe that at nuclear division the flagella

disappear. This degeneration includes also the second flagellum or axostyle as they call it, for they consider that on nuclear division a persisting centrodesmose gives rise to the new axostyles. Theoretically this is a very interesting view but I can find nothing to support it from my preparations which cannot be accused of containing small numbers of flagellates. I cannot find any difference between the flagellate described by me and the one with which HARTMANN and CHAGAS conducted their observations and seeing that both were obtained from the human intestine the most reasonable assumption is that they are identical.

In my previous account I described nuclear division as taking place in the following manner. The large karyosome becomes elongated and finally constricted into two parts. The nuclear membrane then divides and two nuclei result; they remain connected however by the apex of the cone-like elevation where the basal granule is situated. Eventually the basal granule divides and with this the nuclei separate. New flagella are formed either before or after division of the basal granule, as outgrowths from this structure. Sometimes in a single individual nuclear multiplication may go on in this manner till several nuclei are present before division of the body occurs. In addition to this mode of binary fission there is another which may have some connection with conjugation or cyst formation for this reason. The flagellates dividing as I have just described have their bodies packed with food vacuoles while those dividing in the manner about to be considered are generally free from food material. In this second type of division the nucleus divides mitotically in a manner which is of utmost interest for the basal granules of the flagella, still maintaining their flagella, function as centrosomes in exactly the same manner as do the basal granules in the collar cells of *Clathrina coriacea* as described by ROBERTSON and MINCHIN (25). Some stages of this division were figured by me in my former paper (31) but at the time I did not fully realise their significance. The division proceeds as follows. The large karyosome becomes broken up into a series of rods which arrange themselves in a circular plate, each rod being at right angles to the long axis of the nucleus. The basal granule at the apex of the nucleus has attached to it, at first, the two flagella. Very soon two additional flagella grow out from the basal granule so that at the time the chromatin has become arranged in a plate, as described, the basal granule has four flagella attached to it (Fig. 39). It may be that at this stage the basal granule has already divided,

and that the two flagella grow out after division is complete, but if so the two halves lie so closely together that they appear as a single granule. When divided each daughter basal granule or centrosome moves away with its attached flagella and a spindle is produced with the chromatin disc at the equator (Figs. 41 and 42). The centrosomes separate still more and the chromatin plate splits into two daughter plates each made up of a number of chromatin rods (Fig. 38). I have not been able to determine whether an actual division of the chromosomes, if they can be so called, takes place. I rather think that the chromosomes do not split so that the division is a reducing one. The two plates separate more and more under the influence of the centrosomes (Figs. 40 and 43). Finally the spindle disappears in the middle (Fig. 44) and eventually the daughter nuclei acquire the structure of the original parent nucleus by the massing together of the chromatin rods to form the large karyosome. Nuclear division is followed by division of the body of the flagellate. During the spindle stage it is somewhat difficult to decide whether the outer limits of the spindle represent the nuclear membrane which has become much stretched or whether the membrane disappears entirely during the division. I am inclined to think that the membrane persists throughout the division for in certain instances the outer limits of the spindle stand out very clearly (Figs. 40 and 43). During the whole of this division there is no indication whatever of any other centrosome than that from which the flagella arise and there is no sign of any centrodesmose which is to persist as the axostyle described for *Cercomonas parva* by HARTMANN and CHAGAS. Such an axostyle does not exist in the *Cercomonas* nor is there any rhizoplast connecting the basal granule or centrosome to any other centrosome within the karyosome as these authors depict in Fig. 3 illustrating their paper. The basal granule from which the two flagella spring always appears single. I have not been able to make out a diplosome structure though the possession of two flagella would lead one to expect that two centrosomes would be represented. It may be that they exist but that they are too closely united to be readily detected as separate structures.

Concluding remarks.

From the description of the trypanosomes and leptomonas given above it will be seen that their nuclei are built up on a common plan which is applicable as well to the kinetonucleus as to the

trophonucleus. It is probable that in other members of the group to which these flagellates belong the nuclei will be found to have the same structure. The trophonucleus consists of a nuclear membrane enclosing a clear space in the centre of which is the karyosome. This latter structure contains, in all probability, a plastin basis impregnated with chromatin while its centre is occupied by a centriole or centrosome which initiates nuclear division. In division the centriole first divides and as the two halves separate an intermediate strand remains as a centrodesmose. The chromatin and plastin material of the karyosome is roughly divided into two portions. The nuclear membrane persists throughout this division. Whether in some cases the chromatin material becomes arranged at the equator of a spindle in the form of chromosomes as ROSENBUSCH and others have described I cannot say. I have failed to discover in any of the flagellates belonging to the trypanosome group which I have examined evidence of the formation of chromosomes. The observations are made upon creatures so minute that the mere finding of isolated instances of what might possibly be interpreted as stages in a mitotic division is not sufficient evidence that a real mitosis takes place.

As regards the kinetonucleus it has the same structure as the trophonucleus with the single exception of the presence of the basal granule on the nuclear membrane. I have shown clearly that in *Cercomonas longicauda* this basal granule is a true centrosome and I believe that the position it occupies in the division of the kinetonucleus of *Herpetomonas muscae domesticae* is evidence that it is fulfilling the centrosomic function here also. If it be granted that the basal granule of the flagellum of a trypanosome or allied flagellate is a true centrosome, the question arises, is it necessary to assume that a second centrosome exists within the karyosome of the kinetonucleus? Theoretically, there is a possibility that the basal granule has resulted from the division of an intra-nuclear centrosome. SCHAUDINN supposed it to have arisen in this manner and many of his supporters have followed him in this doctrine. It is, however, exceedingly difficult to obtain any direct evidence of the presence of a centriole within the karyosome of the kinetonucleus. The fact that in division the karyosome may become elongated, as I have shown to be the case for certain broad forms of the cultural stages of *Leishmania tropica*, is in itself hardly sufficient evidence. ALEXEIEFF calls the fibre connecting the two halves of the karyosome of the kinetonucleus a blepharoplastodesmose and concludes that a centriole

must be present. In this connection the structure of the nucleus of the *Cercomonas* described above is most instructive. Here the basal granule of the flagellum is the only representative of the centrosome as is so clearly shown in the mitotic division of the nucleus. There is every reason to suppose that the basal granule is the only centrosome present in this nucleus, and it must be concluded that it has taken up its position upon the nuclear membrane in order to control the flagella. In the simpler type of nuclear division of this flagellate, described above, the karyosome instead of becoming a plate of chromosomes divides by simple constriction. This is exactly what happens with the kinetonuclear karyosome of a trypanosome. In the case of the *Cercomonas* with its large nucleus it is possible especially in the case of the mitotic division, to see fairly definitely that no centrosome exists apart from the basal granule from which the flagella arise. I would suggest that the kinetonucleus of a trypanosome or allied flagellate has the same structure as the nucleus of the *Cercomonas* and that the basal granule of the flagellum is the true and only centrosome which has taken up its position upon the nuclear membrane in connection with the development of the flagellum. In the case of the *Cercomonas* it might be possible from a study of the encysting stages, or the forms emerging from the cysts, to follow the centrosome in or out of the karyosome but though I have examined many cysts of this flagellate I have not been able to arrive at any definite conclusion as to the origin of the basal granule in the first place. In the case of trypanosomes the origin of the basal granule would be still more difficult to determine on account of its minute size. It has been described by SCHAUDINN and others as arising from a division of the kinetonucleus but none of these observations are quite free from criticism; and it is still an open question as to whether the basal granule represents the only centrosome in connection with the kinetonucleus or whether there exists a second centrosome within the karyosome of the kinetonucleus which has given rise by division to the basal granule. If the kinetonucleus of a trypanosome or closely allied flagellate is comparable with the nucleus of *Cercomonas* then there is no necessity to assume that any other centrosome exists than the basal granule situated upon the nuclear membrane.

References to literature.

- 1) ALEXEIEFF, A. (1911): Sur les Cercomonadines intestinales de *Calliphora erythrocephala* Mg. et de *Lucilia* sp. C. R. Soc. de Biol. t. 71 p. 379.
- 2) — (1912): Notes sur les Herpetomonadidae (Trypanosomidae DOFLEIN 1911). Arch. de Zool. expér. et gen. (5) t. 10, Notes et Revue, Nr. 2 p. 29—38.
- 3) — (1912): Homologie entre le stigma des Eugléniens et le kinetonucleus des Flagelles Binucleates. Arch. de Zool. expér. et gen. (5) t. 10, Notes et Revue, No. 3 p. 66—72.
- 4) — (1912): Sur quelques noms de genres des Flagelles qui doivent disparaître de la nomenclature pour cause de synonymie ou pour toute autre raison. Zool. Anz. Bd. 39 No. 23—24.
- 5) — (1910): Sur quelques points de la structure des „Binucleates” de Hartmann. C. R. Soc. de Biol. t. 69 p. 532.
- 6) CHAGAS (1909): Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. t. 1 f. 1 p. 159—218.
- 7) CHATTON, E. et ALILAIRE, E. (1908): Coexistence d'un Leptomonas (Herpetomonas) et d'un Trypanosoma chez un muscicide non vulnérant, *Drosophila confusa*, Staeger. C. R. Soc. de Biol. t. 64 p. 1004.
- 8) — et LÉGER (1911): Sur quelques leptomonas de Muscides et leur leptotrypanosomes. C. R. Soc. de Biol. t. 64 p. 120.
- 9) — et — (1911): Sur l'axostyle ou axoplaste des Trypanosomides des Insectes. C. R. Soc. de Biol. t. 64 p. 575.
- 10) DOFLEIN, F. (1910): Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. 6. Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Frosches. Arch. f. Protistenk. Bd. 19 p. 207—231.
- 11) DUNKERLEY, J. S. (1911): On some stages in the life history of *Leptomonas muscae domesticae*. Quart. J. Mic. Sci. Vol. 56 p. 645—653.
- 12) FANTHAM, H. B. (1912): *Herpetomonas pediculi* n. sp. parasitic in the alimentary tract of *Pediculus vestimenti*, the human body louse. Proc. Roy. Soc. B. Vol. 89 p. 505—517.
- 13) FLU, P. C. (1911): Studien über die im Darm der Stubenfliege *Musca domestica* vorkommenden protozoaren Gebilde. Centralbl. f. Bakt. 1 Abt. (Orig.) Bd. 57 Heft 6 p. 522.
- 14) HARTMANN, M. und CHAGAS, C. (1910): Flagellaten-Studien. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz 2. p. 64.
- 15) LÉGER, L. (1912): Sur la Structure et la mode de multiplication des Flagelles du genre *Herpetomonas*, Kent. C. R. Acad. Sci. t. 134 p. 781—784.
- 16) MACKINNON, D. L. (1910): *Herpetomonas* from the alimentary tract of certain Dung-flies. Parasitology Vol. 3 p. 255—274.
- 17) MINCHIN, E. A. (1909): The structure of *Trypanosoma lewisi* in relation to microscopical technique. Quart. Journ. Mic. Sci. Vol. 53 p. 753—808.
- 18) — (1912): An introduction to the Study of the Protozoa. Edward Arnold, London.
- 19) PATTON, W. S. (1908): *Herpetomonas lygaei*. Arch. f. Protistenk. Bd. 13 p. 1—18.
- 20) — (1910): *Rhynchomonas luciliae* nov. gen. nov. spec. A new flagellate parasitic in the malpighian tubes of *Lucilia serenissima* (Walk.). Bull. Soc. Path. Exot. Nos. 5 and 9.

- 21) PORTER, A. (1910): The life cycle of *Herpetomonas jaculum* (LÉGER) parasitic in the alimentary tract of *Nepa cinerea*. *Parasitology*, Vol. 2 p. 367—391.
- 22) — (1911): The structure and life history of *Crithidia pulicis* n. sp. parasitic in the alimentary tract of *Pulex irritans*. *Parasitology* Vol. 4 p. 237—254.
- 23) PROWAZEK, S. v. (1904): Die Entwicklung von *Herpetomonas* einem mit den Trypanosomen verwandten Flagellaten. (Vorläufige Mitteilung). *Arch. a. d. Kaiserl. Gesundh.* 20 p. 440—452.
- 24) — (1912): Beiträge zur Kenntnis der Protozoen und verwandten Organismen von Sumatra (Deli). *Arch. f. Protistenk.* Bd. 26 p. 250—274.
- 25) ROBERTSON, M. and MINCHIN, E. A. (1910): The division of the Collar cells of *Clathrina coriacea* (Montagu.) a contribution to the theory of the centrosome and blepharoplast. *Quart. Journ. Micr. Sci.* Vol. 53 p. 611—640.
- 26) ROSENBUSCH, F. (1909): Trypanosomen-Studien. *Arch. f. Protistenk.* t. 15 p. 263—296.
- 27) — (1910): Über eine neue Encystierung bei *Crithidia m. d.* *Centralbl. f. Bakt.* 1 Abt. Orig. Bd. 53 Heft 4 p. 387.
- 28) ROUBAUD, E. (1909): Les Trypanosomes pathogenes. *La Maladie du Sommeil au Congo Français.* Masson & Co. Paris.
- 29) STRICKLAND, C. (1911): Description of a *Herpetomonas* parasitic in the alimentary tract of the common green bottle fly *Lucilia* sp. *Parasitology* Vol. 4 p. 222.
- 30) VISENTINI, A. (1912): On the Morphology of the *Leishmania* of Italian Kala Azar. *Quart. Journ. Micr. Sci.* Vol. 58 p. 353—371.
- 31) WENYON, C. M. (1908): *Trypanosoma lewisi* in Third Report of the Wellcome Research Laboratories Khartoum. p. 144.
- 32) — (1910): Some Observations on a Flagellate of the Genus *Cercomonas*. *Quart. Journ. Micr. Sci.* Vol. 55 p. 241—259.
- 33) — (1911): Oriental Sore in Bagdad etc. *Parasitology* Vol. 4. p. 273—344.
- 34) — (1912): Observations on the behaviour of *Leishmania tropica* and allied flagellates in bugs and fleas. *Journ. Lond. Schl. Trop. Med.* Vol. 2 p. 13—26.
- 35) WERNER, H. (1909): Über eine eingeißelige Flagellatenform im Darm der Stubenfliegen. *Arch. für Protistenk.* T. 13 p. 19.

Explanation of Plates.

Plate 1.

Herpetomonas muscae domesticae from preparations fixed in SCHAUDINN'S fluid.

Fig. 1. Dividing flagellate containing four bacteria. The dividing trophonucleus shows the remains of the centrodesmose. The dividing kintonucleus has the characteristic Y-shape while the basal granules occupy a position at the apices of the limbs of the Y where they appear to function as centrosomes. The daughter karyosomes are in the limbs of the Y near the basal granules.

Fig. 2. Early division form showing the dividing basal granule with a centrodesmose. The karyosome of the kinetonucleus is dividing by constriction. Two daughter centrioles are seen within the karyosome of the trophonucleus.

Fig. 3. A form similar to that at fig. 1.

Fig. 4. Note the kinetonucleus with its dividing karyosome and basal granule. The centriole of the trophonucleus is dividing with a long centrodesmose. There are many bacteria in the posterior region of the flagellate.

Fig. 5. An early division form with commencing division of the basal granule and karyosome of the kinetonucleus.

Fig. 6. A dividing form deeply stained and showing the cytostome at the anterior end of the body.

Fig. 7. An early division form showing how the new flagellum may be fully formed even at such an early stage.

Figs. 8 and 9. Show the longitudinal splitting of the body. Note that each daughter flagellate has only a single flagellum.

Fig. 10. Shows the dividing basal granule and karyosome of the kinetonucleus. In the trophonucleus the daughter centrioles are outside the karyosome. There are three bacteria in the posterior part of the body.

Fig. 11. A dividing form as in fig. 2. Note the two centrioles within the karyosome of the trophonucleus.

Plate 2.

Figs. 12, 13, 14, 15, 22 represent *Herpetomonas muscae domesticae* fixed in HERMANN'S fluid. Fixed in this manner the karyosome of the kinetonucleus stains deeply while the rest of the kinetonucleus does not take up the stain as after SCHAUDINN'S fluid.

The basal granule remains attached to the nuclear membrane.

Fig. 12. A dividing form with the basal granule upon the nuclear membrane while the new flagellum is only partly formed.

Fig. 13. A dividing form showing irregular fibres running backwards in the cytoplasm. These may represent the doppelfaden, axostyle, canal etc. of various authors.

Fig. 14. A flagellate similar to that at fig. 12.

Fig. 15. Shows very well the kinetonucleus dividing under the influence of the basal granules.

Fig. 22. An early division stage.

Fig. 16—20 and 26. Flagellates (*Leptomonas*) developed in culture from the faeces of the flea *Pulex irritans*. Preparations fixed in SCHAUDINN'S fluid.

Fig. 16. The trophonucleus shows the dividing centriole and the centrodesmose extending across the undivided karyosome. The kinetonucleus has a dividing karyosome while the single basal granule lies on the nuclear membrane.

Fig. 17. A typical flagellate showing the structure of the nuclei when not dividing.

Fig. 18. A flagellate showing the early stages of nuclear division.

Fig. 19. A flagellate showing a more advanced stage of division with the karyosomes of the two nuclei divided and the new flagellum already formed from the daughter basal granule.

Fig. 20. A flagellate showing division of the trophonucleus with daughter centrioles and divided karyosome and centrodesmose.

Fig. 26 a—h. Various stages in division of the trophonucleus.

Figs. 21 and 25. Flagellates developed from *Leishmania tropica* in culture on N.N.N. blood agar media. The preparations were fixed in SCHAUDINN'S fluid and show that the flagellates have the same structure as the flagellates from the fleas.

Plate 3.

Figs. 28—30 and 33—36. *Trypanosoma rhodesiense* as seen in dried smears from the liver of a heavily infected rat. The smears were stained by ROMANOWSKY stain and show remains of degenerate trypanosomes and the manner in which the basal granule remains attached to the membrane of the kinetonucleus. The proximal part of the flagellum is seen to be the finest portion. The thicker part is probably enclosed in the ectoplasmic sheath, while the thin part represents that portion of the flagellum which is naturally intracorporeal.

Fig. 31. One of the "posterior nuclear forms" of *Trypanosoma rhodesiense* fixed in SCHAUDINN'S fluid. Note the structure of the kinetonucleus.

Figs. 45—82. Trophonuclei of *Herpetomonas muscae domesticae* to show the great variation in the arrangement of the constituent parts.

Figs. 37—44. *Cercomonas longicauda* from the human intestine as seen when growing on the surface of an agar medium. The preparations were fixed in SCHAUDINN'S fluid.

Fig. 37. A typical non-dividing flagellate.

Fig. 39. An early division stage with the new pair of flagella developed and the karyosome becoming transformed into a disc of chromatin rods.

Fig. 41. The basal granule or centrosome has divided and each half with its two flagella has taken up a position at the apex of the spindle.

Fig. 38. The equatorial disc of chromatin rods (chromosomes?) is dividing to form two daughter plates. The two centrosomes occupy the apices of the spindle.

Fig. 40. Spindle with two centrosomes and two daughter plates of chromatin rods.

Fig. 42. Spindle with some indication of a spindle fibre system.

Fig. 43. Elongate spindle stretching across the body of the flagellate.

Fig. 44. The spindle has divided at its centre and the two daughter nuclei are formed while the chromatin is commencing to condense into the karyosomes characteristic of the resting nucleus.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Notiz zur *Herpetomonas*-Morphologie sowie Bemerkung zu der Arbeit von WENYON.

Von

S. v. Prowazek.

In bezug auf die Auffassung der *Herpetomonas*-Morphologie bestehen bis jetzt bei gleichem Tatbestande Verschiedenheiten, die sich aus einer verschiedenen Interpretation der morphologischen Strukturen ergeben. Obzwar ich jetzt über keine neuen Befunde verfüge und die Frage so weiter nicht fördern kann, möchte ich in Kürze auf meine vorläufig mitgeteilten Befunde aus dem Jahre 1904 (Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt Bd. XX, Heft 3), um eventuelle Mißverständnisse zu vermeiden, hinweisen. Dort wurde *Herpetomonas* als zweigeißelig beschrieben, da die Mehrzahl der vegetativen großen Formen zwei dicke Rhizoplasten sowie zwei Geißelfäden, die durch eine rot färbbare (GIEMSA) „Hautschicht“ verbunden waren, besaß. Bei der Teilung entstanden neben den ursprünglichen zwei Mutterrhizoplasten zwei Tochterrhizoplasten sowie zwei noch wachsende, daher verschieden lange Tochtergeißeln. Je nachdem die definitive Teilung des Zelleibes früher oder später einsetzte, entstanden als Tochterprodukte (a) Individuen mit einer langen und einer kurzen Geißel oder (b) Individuen mit gleich langen Geißeln oder seltener (c) eingeißelige Formen, von denen ich annahm, daß die zweite Geißel später entsteht. WENYON faßt die eingeißelige Form als die Urform auf, während die Formenreihe (a und b) mit vier ungleich langen oder gleich langen Geißeln nicht in meinem Sinne als ein Zwei-, sondern als Vierteilungsstadium gedeutet wird. WENYON stützt seine Interpretation be-

sonders auf die Beobachtung der kleinen, anscheinend involvierten oder zur Encystierung führenden Formen, die eingeißelig sind. Bei den sog. „Geschlechtstieren“, die den Blepharoplast bereits neben dem Hauptkern besaßen, beobachtete ich aber nebstdem auch noch zwei Geißeln (Fig. 5 a, b, c). Diese Tiere vermehrten sich auch, meistens unterlag der Lokomotionsapparat einer Resorption. Bei der Auffassung, welche Form als Typus anzusprechen ist, dürften statistische Untersuchungen von Wert sein, denn mir scheint es doch bemerkenswert zu sein, daß die Mehrzahl der in Rovigno beobachteten Formen zwei Geißeln besaß. Schließlich möchte ich betonen, daß auf Grund der Durchsicht eines Präparates aus dem Jahre 1904 Herr WENYON meine Flagellaten für identisch mit der von ihm beobachteten erklärt und mir auch seine Präparate eingeschickt hatte, wofür ich meinen besten Dank ausspreche.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Einige neue Befunde aus der Entwicklungsgeschichte von *Arcella vulgaris* (EHRBG.).

Von
Xenia Fermor.

(Hierzu Tafel 4.)

Der Lebenscyclus von *Arcella vulgaris* ist sehr kompliziert und umfaßt mehrere verschiedenartige Fortpflanzungsvorgänge, welche im allgemeinen auf zwei Typen zurückgeführt werden können: einen vegetativen und einen geschlechtlichen.

Die vegetative Fortpflanzung von *Arcella* erfolgt auf dreierlei Bahnen: durch Zweiteilung (HERTWIG und LESSER — 1874, DANGEARD — 1903, ELPATIEWSKY — 1907, SWARCZEWSKY — 1908), durch Knospung (SWARCZEWSKY — 1908) und durch Bildung von Pseudopodiosporen (ELPATIEWSKY — 1907, SWARCZEWSKY — 1908).

Der geschlechtlichen Fortpflanzung gehört zunächst der Fall des Zerfalls von *Arcella* in Macro- und Microgameten, die miteinander copulieren, an (AWERINZEW — 1906, ELPATIEWSKY — 1907), ferner die sog. „Chromidiogamie“ (SWARCZEWSKY — 1908) oder Conjugation (BÜTSCHLI — 1875).

Die bisher bekannten Fälle der Fortpflanzung von *Arcella* ergeben bei weitem noch nicht sämtliche möglichen Variationen. Die Fortpflanzung dieses Rhizopoden ist zweifellos noch komplizierter, als sie bisher beschrieben worden ist; die gleichen Prozesse können in weitem Umfange variieren in Abhängigkeit von verschiedenen Lebensbedingungen.

Meine Beobachtungen über die Entwicklung von *Arcella* habe ich im Verlaufe von drei Monaten angestellt sowohl an frischem

Material als auch an Präparaten, wobei als Fixierungsmittel die SCHAUDINN'sche Mischung (2 Teile konzentr. wässrige Sublimatlösung und 1 Teil Alcohol absolut.) angewandt wurde; gefärbt habe ich die Präparate mit Boraxkarmin, Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN, hauptsächlich jedoch mit Hämatoxylin nach DELAFIELD.

Bei meinen Beobachtungen gelang es mir in der Entwicklung von *Arcella* einen neuen Fall wahrzunehmen, welcher eine Ergänzung der vorher beschriebenen darstellt und in der Hinsicht ein Interesse gewährt, daß er die Existenz einer engen Abhängigkeit der Fortpflanzung von *Arcella* von ihren anderen Funktionen und äußeren Bedingungen bestätigt.

Die am Ende des Sommers aus einem Teiche in der Umgegend von St. Petersburg erhaltenen *Arcella* waren in Aquarien in unserem Laboratorium untergebracht; aus diesen wurden sie behufs Erlangung neuer Kulturen in kleine Glasgefäße übergeführt mit frisch zubereitetem Nährboden: Heuinfus mit Beigabe von Blut, Fleischsaft u. dgl.

Die auf den frischen Nährboden übergeführten *Arcella* begannen sich rasch durch Teilung zu vermehren. Die Größe der sich teilenden *Arcella* blieb dieselbe, wie zu Beginn der Kultur. In einzelnen Fällen waren die Tochterschalen größer oder kleiner als die Mutterschalen, größtenteils waren sie jedoch diesen gleich, so daß die mittlere Größe von *Arcella* unverändert blieb. Die intensive Vermehrung von *Arcella* dauerte in meinen Kulturen 10—12 Tage; darauf wurde sie merklich schwächer, wobei die *Arcella* an Größe abnahmen, schließlich hörte die Teilung fast vollkommen auf. Um diese Zeit bildeten einige *Arcella* Cysten innerhalb der Schalen, deren Beschreibung weiter unten gegeben wird. Der größte Teil der *Arcella* wies jedoch folgende Erscheinung auf.

Arcella sondert wie auch vor der Teilung sämtliche unverdaute Nahrungsreste aus. Die Chromidien ziehen sich zu einer unregelmäßigen kompakten Masse zusammen, die bisweilen in eine geringe Anzahl einzelner Teile zerfällt. Ein Teil des Protoplasmas tritt aus der Schale aus und bildet, indem es in Zusammenhang bleibt mit dem übrigen Inhalt derselben, an der Öffnung eine blasenförmige Anschwellung, die an Größe fast der Schale gleichkommt oder dieselbe um ein geringes übertrifft (Fig. 1). Die Außenschicht des Protoplasmas wandelt sich in eine feine durchsichtige Hülle um, die keine besondere Struktur erkennen läßt. In dieses kugelförmige Gebilde, welche ich „Cyste“ bezeichne, strömt langsam der ganze Protoplasmaleib des Rhizopoden über, worauf sich die „Cyste“ von der

Schale absondert. Die Hülle derselben wird allmählich derber, erlangt eine unebene Oberfläche, die mit zugespitzten Vorwölbungen versehen ist. An der Stelle der früheren Vereinigung mit der Schale bleibt eine Öffnung. Die Kerne gehen nicht immer in die „Cyste“ über, häufig werden sie vollkommen aus dem Protoplasma ausgestoßen und bleiben in der leeren Schale. Nach der Abtrennung der „Cyste“ von der Schale, teilt sich der Inhalt derselben, der zunächst eine formlose Masse darstellt, in eine geringe Zahl (2—4) großer Amöben, von denen jede auf ihrer Oberfläche eine dünne, strukturlose, elastische Hülle bildet (Fig. 2). An der Bildung dieser Amöben beteiligt sich sowohl das Protoplasma des mütterlichen Organismus als auch die in Gestalt von kleinen Körnern in dem ganzen Amöbenkörper verteilte Chromidialsubstanz. Die Kerne liegen, wenn sie nicht vorher aus dem Protoplasma ausgestoßen waren, in Gestalt von chromatinfreien, schwach tingierbaren Bläschen innerhalb der Amöbe, wo sie allmählich degenerieren und mit dem Protoplasma verschmelzen. Die Amöben treten aus der allgemeinen „Cyste“ durch die an der Vereinigungsstelle derselben mit der Schale nachgebliebenen Öffnung aus, bleiben größtenteils nicht an der Oberfläche, sondern fallen zu Boden. Um diese Zeit werden in der Kultur neben Schalen, die bisweilen zwei degenerierende Kerne enthalten, viele leere kugelförmige Hüllen angetroffen, die dem Protoplasmakörper von *Arcella* und den aus ihr entstandenen Amöben einen temporären Schutz gewährten, solange letztere noch keine eigene Hülle gebildet haben.

Die Amöben weisen die mannigfaltigste Form auf: sie sind kugelförmig, birnförmig, in verschiedenen Richtungen gekrümmt, bisweilen haben sie ein stark ausgezogenes Ende (Fig. 4); niemals bilden sie jedoch feine radiäre Pseudopodien ähnlich den Pseudopodiosporen. Die Form der Amöben ändert sich, jedoch dermaßen langsam, daß diese Umgestaltungen nur bei längerer Beobachtung wahrgenommen werden können: eine derartige Amöbe, die mir vollkommen unbeweglich zu sein schien, ließ ich in einem Tropfen Wasser und konnte nach 24 Stunden wahrnehmen, daß sie ihre Form geändert hat. Die Hülle der Amöben nimmt eine dem Protoplasmakörper vollkommen entsprechende Form an und folgt den Veränderungen desselben. An lebenden Exemplaren liegt das Protoplasma der Hülle dicht an, an fixierten kontrahiert es sich stark und steht ab.

Die Amöben können längere Zeit liegen bleiben ohne irgendwelche Zeichen einer weiteren Entwicklung zu offenbaren. In diesem Stadium durchlebt *Arcella* eine Periode einer Verlangsamung der Lebensprozesse, gleichsam eine Periode der Ruhe nach der inten-

siven Vermehrung durch Teilung. Eine Beschleunigung der Entwicklung der Amöben gelang es mir durch Zufügen von frischem Heuinfus und Wasser zur alten Kultur zu erzielen. Hierbei erfolgte die Entwicklung folgendermaßen: die Amöbe nahm an Größe zu, verlor ihre unregelmäßige Form, wurde kugelförmig; an einer Seite derselben entstand darauf eine Delle, wobei die Konvexität der entgegengesetzten Seite zunahm. Die Hülle folgte den Formveränderungen des Körpers, erhielt mehr Ähnlichkeit mit der Schale von *Arcella* und wandelte sich schließlich in die endgültige Schale um. Von dem Zeitpunkte des Beginns der Bildung der Amöben bis zu ihrer endgültigen Umwandlung in die ausgebildete Form, ist das Chromatin in ihnen ausschließlich in Form der Chromidialsubstanz vorhanden. Letztere ist in Gestalt von kleinen Körnchen im ganzen Körper der Amöbe verstreut; mit der fortschreitenden Entwicklung nähern sich die Körnchen der Oberfläche des Amöbenkörpers (Fig. 3), nähern sich einander, kondensieren sich und bilden Chromidien, welche die für erwachsene *Arcella* charakteristische Ringform annehmen. An zwei Stellen des Ringes, gewöhnlich an zwei entgegengesetzten Polen bildet das Chromatin kompaktere Anhäufungen, die Kugelform annehmen, sich von der übrigen Masse desselben absondern, von hellen Ringen umgeben werden und sich zu Kernen umwandeln. Hierbei können beide Kerne auch nicht gleichzeitig erscheinen, so daß häufig *Arcella*-exemplare angetroffen werden mit einem Chromidialring und einem Kerne oder mit einem vollkommen ausgebildeten und einem im Beginn der Bildung begriffenen Kerne. In einigen Amöben nimmt die Chromidialsubstanz nicht von vornherein eine Ringform an, sondern bildet zunächst ein unregelmäßiges Netz, das im ganzen Amöbenkörper ausgebreitet ist. In zwei Gebieten dieses Netzes treten Kerne auf, worauf erst die Chromidialsubstanz einen Ring bildet, der die Kerne verbindet.

Die in meiner Kultur auf die beschriebene Weise entstandenen *Arcella* vermehrten sich weiterhin durch Teilung; diese Periode dauerte jedoch kürzere Zeit als das erstmal, und nach 3—4 Tagen begannen die *Arcella* Depressionszustände zu offenbaren. Die Teilung hörte fast vollkommen auf; der größte Teil der Tiere starb ab, wobei ihr Körper aus der Schale austrat und zerfiel, indem er im Wasser zerging; einige *Arcella* bildeten, wie auch das erstmal, Cysten innerhalb der Schalen; sehr wenige von ihnen wiederholten den Bildungsprozeß von Amöben durch Austritt von Protoplasma in die an der Schalenöffnung entstehende blasenförmige Hülle.

Der Zerfall des Körpers von *Arcella* in großen Amöben ist eine

ungeschlechtliche Fortpflanzungsweise, welche demjenigen Falle der Bildung von Pseudopodiosporen sehr nahe steht, in welchem letztere sich von dem aus der Schale in Gestalt eines „Pseudoplasmodiums“ ausgetretenen mütterlichen Organismus abschnüren. Die Analogie beider Erscheinungen ist dermaßen nahe, daß sie als Variationen eines Prozesses angesehen werden können, hervorgerufen durch äußere Ursachen und innere, in der *Arcella* selber gelegene Faktoren. Bei der Bildung von Pseudopodiosporen dokumentiert sich die Fortpflanzungsfähigkeit von *Arcella* im höchsten Grade der Intensität: von ihrem Körper sondert sich eine große Anzahl von Amöben ab, die sich rasch entwickeln und in verhältnismäßig kurzer Zeit in ausgewachsene Tiere umwandeln. In meinen Kulturen, die infolge einer verstärkten Vermehrung durch Teilung abgeschwächt waren und sich unter recht ungünstigen äußeren Bedingungen befanden, da das Wasser in den Gefäßen allmählich verdunstete und gleichzeitig Fäulnisprozesse der organischen Reste ihren Anfang nahmen, konnte die vegetative Vermehrung von *Arcella* nicht so rasch vor sich gehen. Der mütterliche Organismus konnte statt einer großen Anzahl von Pseudopodiosporen nur sehr wenige Tochterorganismen bilden. Eine Verzögerung in der Weiterentwicklung der letzteren gab den Grund ab zur Bildung einer zum Schutze erforderlichen Hülle um dieselben. Im Zusammenhang mit der Verlangsamung sämtlicher Lebensprozesse bildeten sich die Kerne auch bedeutend später.

Außer einer unmittelbaren Umwandlung der Amöben in *Arcella*, kann bei denselben noch ein anderer Entwicklungsgang beobachtet werden, den ich jedoch leider nicht bis zum Schlusse habe verfolgen können. In einigen Amöben sammelt sich die Chromidialsubstanz in kleine, verdichtete Bezirke, die Kugelform annehmen und den Kernen den Ursprung geben (Fig. 4). Für die Bildung dieser Kerne geht die ganze Chromidialsubstanz auf, die sich in den Amöben vorfindet. Um jeden Kern sondert sich ein Teil des Protoplasmas ab, und der ganze Körper der Amöbe innerhalb der Hülle zerfällt in kleine einkernige Amöben (Fig. 5). Derartige Fälle habe ich nur sehr selten angetroffen, infolgedessen kann ich auch nichts bestimmtes über die weitere Entwicklung der kleinen Amöbchen mitteilen. Möglicherweise verwandeln sie sich direkt in *Arcella*, in welchem Falle dieser Prozeß wieder an die Bildung von Pseudopodiosporen erinnert, bei welcher die von dem Pseudoplasmodium abgesonderte Amöbe in einzelne Teile zerfällt, wobei vorher eine Bildung von Kernen aus der Chromidialsubstanz erfolgt. Es kann jedoch auch

angenommen werden, daß hier ein geschlechtlicher Prozeß vorliegt, wobei der Bildung von *Arcella* eine Copulation vorhergehen muß; in diesem Falle handelt es sich um Erscheinung, die demjenigen von SCHAUDINN (1903) bei anderen Rhizopoden beschriebenen analog ist.

Die von mir beschriebenen Fälle der Entwicklung von *Arcella vulgaris* bestätigen abermals die Kompliziertheit und Mannigfaltigkeit ihres Lebenscyclus. Sämtliche Beobachtungen an den Protozoen konstatieren die Tatsache, daß der Entwicklungscyclus derselben sehr kompliziert ist, wobei in den Cyclen derselben beständig verschiedene Schwankungen und Variationen beobachtet werden in Abhängigkeit von äußeren Faktoren, da bei den einzelligen Organismen die Funktionen der Fortpflanzung und die vegetativen Prozesse räumlich voneinander nicht getrennt sind. „Die Geschlechtszellen der Metazoen sind — dank ihrer scharfen Differenzierung — frei von irgendwelchen anderen Funktionen, während die Protozoenzellen gleichzeitig eine große Anzahl verschiedener Funktionen ausüben; bei den Mehrzelligen müssen somit diese Prozesse eo ipso in einer einfacheren Form verlaufen, als bei den Einzelligen“ (AWERINZEW 1910).

Die Frage über die Cysten und ihre weitere Entwicklung ist noch bei weitem nicht klargestellt, infolgedessen auch der Lebenscyclus von *Arcella* noch durchaus nicht als vollständig erforscht angesehen werden kann.

HERTWIG und LESSER (1874), darauf auch andere Forscher, die an *Arcella* gearbeitet hatten, bemerkten zu verschiedenen Zeiten infolge irgendwelcher unaufgeklärt gebliebenen Ursachen die Bildung von Cysten innerhalb der Schalen. MARTINI (1905) hat diesen Prozeß genau verfolgt. In meinen Kulturen finden sich gegenwärtig zahlreiche Cysten von *Arcella vulgaris*, die sich in folgender Weise gebildet haben.

Vor der Encystierung sondert *Arcella* sämtliche Nahrungsreste aus sich aus; ihr Körper löst sich von der Schale ab, indem er sich kontrahiert, nimmt eine der Kugel nahe, leicht komprimierte Form an und umgibt sich mit einer Membran. Die Kerne, welche bereits Degenerationserscheinungen aufweisen, nähern sich einander und lagern sich größtenteils im Zentrum. Die Chromidien nehmen eine unregelmäßige Form an, zerfallen zunächst in große, darauf kleinere Teile (Fig. 6) und schließlich in einzelne Körner, welche in der ganzen Cyste zerstreut werden, hauptsächlich jedoch in der Mitte um die Kerne konzentriert sind; näher zur Oberfläche sind sie nur in geringer Zahl vorhanden. Um diese Zeit erscheinen im Proto-

plasma zahlreiche kugelförmige Gebilde, welche MARTINI als „nucleolenähnliche Körper“ bezeichnet und welche eine unaufgeklärte temporäre Rolle im Leben der Cyste spielen (Fig. 7). Die Binnenkörper nähern sich allmählich der Kernoberfläche und treten in das Protoplasma aus; schwer zu entscheiden ist es, wie sich ihr Chromatin verhält: ob es sich mit der Chromidialsubstanz vermischt oder vollkommen degeneriert. Die chromatinfreien Kerne verschmelzen miteinander und verschwinden allmählich vollkommen, indem sie sich im Protoplasma auflösen (Fig. 8). Die weitere Entwicklung der Cysten besteht darin, daß auch die „nucleolenähnlichen Körper“ zerfallen und der ganze Cysteninhalt eine homogene feinkörnige Masse darstellt (Fig. 9). Auf diesem Stadium, bis zu welchem auch MARTINI seine Beobachtung fortgeführt hat, befinden sich die Cysten bei mir bereits über einen Monat ohne irgendwelche Anzeichen einer weiteren Umwandlung zu offenbaren. Augenscheinlich ist für ihre Weiterentwicklung ein recht langer Zeitintervall erforderlich; wahrscheinlich haben hierbei auch die Jahreszeit und andere äußere, möglicherweise auch innere Bedingungen Bedeutung. Die Beobachtungen über die Entwicklung der Cysten und die Klarlegung ihrer Bedeutung im Leben von *Arcella* werden der Gegenstand meiner weiteren Arbeit sein.

Ich möchte die Gelegenheit nicht versäumen, auch an dieser Stelle meinem Lehrer Herrn Prof. S. AWERINZEW für seinen freundlichen und aufmerksamen Beistand bei meiner Arbeit meinen innigen Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

- 1) AWERINZEW, S.: Die Süßwasserrhizopoden. Trav. Soc. Imper. natur. St. Petersburg. Bd. 34 1906.
- 2) —: Über die Stellung im System und die Klassifizierung der Protozoen. Biol. Centralbl. Bd. 30 1910.
- 3) BÜTSCHLI, O.: Zur Kenntnis der Fortpflanzung bei *Arcella vulgaris* EHRBG. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 11 1875.
- 4) DANGEARD: Contribution à l'étude des Diplozoaires. Comp. rend. Soc. l'Acad. d. Sciences Paris T. 135 1903.
- 5) ELPATIEWSKY, W.: Zur Fortpflanzung von *Arcella vulgaris* EHRBG. Arch. f. Protistenk. Bd. 10 1908.
- 6) HERTWIG, R.: Über Encystierung und Kernvermehrung bei *Arcella vulgaris*. Festschr. zum 70. Geburtstag von C. v. KUPFFER. Jena 1899.

46 XENIA FEBMOR, Entwicklungsgeschichte von *Arcella vulgaris* (EHRBG.).

- 7) HERTWIG u. LESSER: Über Rhizopoden und denselben nahestehende Organismen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 10 (Suppl.) 1874.
- 8) KHAINSKY, A.: Untersuchungen über Arcellen. Arch. f. Protistenk. Bd. 21 1910.
- 9) MARTINI, E.: Beobachtungen an *Arcella vulgaris*. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 79 1905.
- 10) SCHAUDINN, F.: Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte Bd. 19 1903.
- 11) SWARCZEWSKY, B.: Über die Fortpflanzungserscheinungen bei *Arcella vulgaris* EHRBG. Arch. f. Protistenk. Bd. 12 1908.

Tafelerklärung.

Tafel 4.

Fig. 1. Austritt des Protoplasmas aus der Arcellenschale.

Fig. 2. Eine „Cyste“, in welcher sich der Protoplasmakörper der *Arcella* in Amöben geteilt hat.

Fig. 3. Ein späteres Stadium der Entwicklung einer Arcellenamöbe.

Fig. 4. Eine Arcellenamöbe, die im Begriff ist in kleine Amöbchen zu zerfallen. Aus der Chromidialsubstanz haben sich die Anlagen der Kerne gebildet.

Fig. 5. Kleine Amöbchen, die sich aus dem Körper der Amöbe gebildet haben und innerhalb der Hülle liegen.

Fig. 6—9. Bildung der Cysten.

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten Hamburg.
Leiter: Obermedizinalrat Prof. Nocht.)

Studien zur Biologie der Protozoen. VI.

Von
S. v. Prowazek.

(Hierzu Tafel 5 und 7 Textfiguren.)

I. Untersuchungen über die Protozoenmorphie.

In früheren Studien¹⁾ wurde mehrfach der Versuch gemacht, eine rein formale Sondergesetzlichkeit, die aus der uns bekannt gewordenen Tatsachenmannigfaltigkeit des Chemischen und Physikalischen nicht erklärbar ist und demnach als solche neben diesen als unreduzierbare Größe bestehen bleibt, unter dem nichts präjudizierenden Ausdruck „Morphe“ in den Betrachtungskreis der Protistenbiologie einzuführen und auf ihrer Grundlage eine reine, rationelle Morphologie aufzubauen.

Historisch betrachtet, besitzt der Begriff der Morphe, die als intensiver Mannigfaltigkeitsfaktor verschiedenen Gestaltungen mit gewissen Erweiterungen zukommen kann und sich den extensiven, chemischen, (diskontinuierlichen) und physikalischen Verschiedenheiten entgegensetzt, zunächst mit dem bekannten „Ganzen, das die Teile bestimmt“ von SACHS u. RAUBER eine gewisse Verwandtschaft. Weiter findet man ohne Mühe Analogien zu den

¹⁾ Zur Regeneration der Algen. Biol. Centralbl. Bd. 27 1907. Arch. f. Protistenk. Bd. 20 p. 204 1910. „Einführung in die Physiologie der Einzelligen.“ Teubner 1910.

grundlegenden Ermittlungen von DRIESCH, sowie zu dem neueren Morphebegriff (1912) von GURWITSCH¹⁾. Nicht unerwähnt dürfen hier die Untersuchungen von NOLL²⁾ über Morphästhesie bleiben, derzufolge die Pflanzenorgane sich in bestimmter Weise nicht zu einem einzelnen Faktor sondern zum Ganzen ausbilden. Mehr in das Gebiet des Physiologischen übertrug in der Folge SCHNEIDER³⁾ in seinem „Vitalismus“ die Morphästhesie und ließ den Zustand der Gesamtgestaltung den Organismus als Positionsreiz empfinden. In unserem Sinne kommt dem Begriff der Morphe ein formaler Charakter zu, durch den sich der Organismus als historisch gewordenes, typisch Gestaltetes den Einflüssen der Umwelt entgegensetzt. In diesem Sinne wird der Begriff der Morphe weiter gefaßt und wir stoßen auf ihre Rudimente bereits bei den Kristallen. —

Die Cytomorphe besitzt mit der Parametermorphe der Kristalle eine gewisse Verwandtschaft — nur daß bei diesen trotz der homogenen Massenverteilung, durch die an und für sich ein jeder Teil dem anderen gleich ist, nach Störungen, die aus der Umwelt kommen, der bestimmte, spezifische, gleichfalls weiter nicht erklärable Richtungsbau wiederhergestellt wird, worauf Ruhe eintritt, während die Organismen als inhomogene Systeme ihre spezifische Morphe zu erhalten trachten, ohne daß es dabei zu einem Ausgleich zu kommen braucht.

(BECKENKAMP⁴⁾ bezeichnet die Kristalle als homogene Körper mit einer Periode von submikroskopischer Dimension.)

Trotz aller Erklärungsbestrebungen, die in ihrer extensiven Fassung bis auf HAÜY, BRAVAIS, SOHNKE u. a. zurückgehen und heuristisch im Grunde genommen nichts aussagen sondern die Annahme nur zurückdrängen, muß schließlich BECKENKAMP einen asymmetrischen Bau der Moleküle gleichfalls annehmen und ihnen bestimmt geartete Richtungswirkungen maximaler und minimaler elektrischer und magnetischer Kräfte zugrunde legen. Mit solchen „Erklärungen“ kommen wir aber, sobald wir nur die Regeneration der Kristalle betrachten, nicht weiter. — Die Morphe der Zellen ist in den früheren Ausführungen mit den spezifischen, gegebenen Struk-

¹⁾ A. GURWITSCH: Die Vererbung als Verwirklichungsvorgang. Biol. Centralbl. Bd. 32 Nr. 8 1912.

²⁾ NOLL: Landwirtschaftl. Jahrb. 1900 sowie Biolog. Centralbl. Bd. 23 1903; ferner DRIESCH: Naturbegriffe u. Natururteile. Leipzig (Engelmann) 1904 p. 120.

³⁾ K. C. SCHNEIDER: Vitalismus. F. Deuticke, Leipzig u. Wien 1903.

⁴⁾ J. BECKENKAMP: Grundzüge einer kinetischen Kristalltheorie. Sitz.-Ber. d. phys. med. Gesellschaft z. Würzburg 1911.

turen gewisser Kolloide, die unter dem Sammelausdruck „Lipoide“ in der Biologie zusammengefaßt werden und deren Vorkommen auch im Protoplasma auf Grund verschiedener Versuche (tropfige Entmischung, Myelinfiguren, Saponinlöslichkeit, Verseifung, Azetonverhalten usw. usw.) erschlossen wird, in Zusammenhang gebracht worden.

In einem Referat (Naturwiss. Rundschau XXVI. 379) bemängelte der Referent (E. J.) den aufgestellten „naturphilosophischen“ Begriff der Morphe, der hierdurch mit einer materiellen chemisch-physikalischen Vorstellung des Lipoids verknüpft wird, so daß in letzter Linie diese Substanz der „Träger“ der Morphe ist, während vorher gegen alle „Träger“ begriffliche Stellung genommen worden ist.

„Trägt“, „hat“ das Lipoid die Morphe, was ist sie dann selbst, was agglutiniert sie an den Träger? — In den erwähnten Ausführungen, deren Fassung allerdings damals ungenau und unscharf war, sollten jene Substanzen nur als Verwirklichungsfaktoren der Morphe gelten, wobei durchaus nicht die extensive Seite ihres Wesens sondern nur ihre intensive Mannigfaltigkeit in Betracht kam.

Nicht als „Substanzen“, als Kapazitätsfaktoren bestimmten sie die Morphe, sondern als Intensitäten oder trivial ausgedrückt als „innere Protoplasmaspannungen“ brachten sie das Spezifische des länglichen *Colpidium*, der gedrungenen *Glaucoma* zum Ausdruck und zwar wie wir noch genauer sehen werden nur im ersten Grade — die eigentlichen formenbestimmenden Faktoren sind größtenteils in der Pellicula und im Ectoplasma zu suchen. Substanzen und Kapazitätsfaktoren unterliegen ja dem Erhaltungsgesetz, das der Morphe fremd ist, sie kommt und verschwindet, sie differenziert sich innerhalb des Entwicklungskreises. — Auch die „toten“ Kolloide treten schließlich in den Wirkungsbereich der neuen, intensiven, morphogenetischen Faktoren ein und in ihrer Facies tauchen plötzlich „vitale“ Züge auf — ihnen kommt eine „Lebenskurve“, „Vorgeschichte“ sowie ein „Altern“ zu. „Im Gegensatz zu den Kristalloiden ist somit jedes Kolloid ein eigenartiges Individuum“ (BECHHOLD: Die Kolloide in Biologie und Medizin, Steinkopf Dresden 1912, p. 65 ff.). „Andererseits bilden die Lipoide in der Zelle eine biologische Einheit, sozusagen ein Organ (oder mehrere) der Zelle, welchem als solchem gewisse lebenswichtige Funktionen zukommen, die sowohl vorwiegend passiver als auch aktiver Natur sein können“ (IVAR BANG: Chemie und Biochemie der Lipoide, Wiesbaden, J. F. Bergmann 1911). —

Auf dem extremen Standpunkt einer Negation jeglichen Naturplurismus verharrend, könnte nun zugegeben werden, daß zwar die Morphe aus den bekannten statischen, kinetischen, elektrischen u. a. Energien nicht ableitbar ist, daß sie aber durch den neueren Begriff der Oberflächenenergie, den WILHELM ¹⁾ und später WOLFGANG OSTWALD ²⁾ eingeführt haben, überflüssig wird. Bei der nun folgenden Untersuchung soll nicht darüber gerechnet werden, ob der Begriff „Energie“ nichts anderes als ein Maßbegriff ist, der **nur** über Quantitäten etwas aussagen kann, oder ob ihm im Grunde genommen doch etwas von der „Substanz“ anhaftet. — Die Oberflächenenergie ist der Definition zufolge ein Produkt aus dem diskontinuierlichen, addierbaren, sowie zerlegbaren Kapazitätsfaktor Oberflächengröße und dem Intensitätsfaktor Oberflächenspannung ($E_0 = F \times H$). Der Kapazitätsfaktor müßte einem Erhaltungsgesetz unterliegen, das für die Organismen zunächst unbekannt ist.

Zu Beginn der Untersuchung wurde betont, daß die Morphe und zwar nicht bloß die Morphe der Organismen sondern teilweise auch die der Kristalle keine summierbare, zerlegbare Größe sondern eine Intensität ist, deren jeder Teil wieder ein Ganzes liefern kann. Demnach müssen wir hier besonders auf den Intensitätsfaktor der Gleichung nämlich auf die Oberflächenspannung unser Augenmerk lenken.

Wo. OSTWALD ³⁾ unterscheidet zwei Arten von Oberflächenspannungen: eine positive Oberflächenspannung, die beim Vorhandensein einer freien Energie die Oberfläche zu verkleinern sucht und eine weniger oft beobachtete, negative Oberflächenspannung (Binnendruck), die in dem gegebenen Falle die Oberfläche vergrößert — sie treibt beispielsweise die Lezithine und Myeline zur Annahme der abenteuerlichen Myelinfiguren, Fäden u. a. m.

Die positive Oberflächenspannung nimmt proportional der zunehmenden Temperatur ab, die negative Oberflächenspannung nimmt zu.

Um das H., die positive bzw. negative Oberflächenspannung der einzelnen, spezifisch gestalteten Organismen zu bestimmen, müßten wir unter anderem den Kugelradius 1 des spezifischen Protoplastropfens kennen — eine Forderung, die derzeit technisch unausführbar ist, da wir im Hinblick auf die Spezifität das H des Kolpidien-

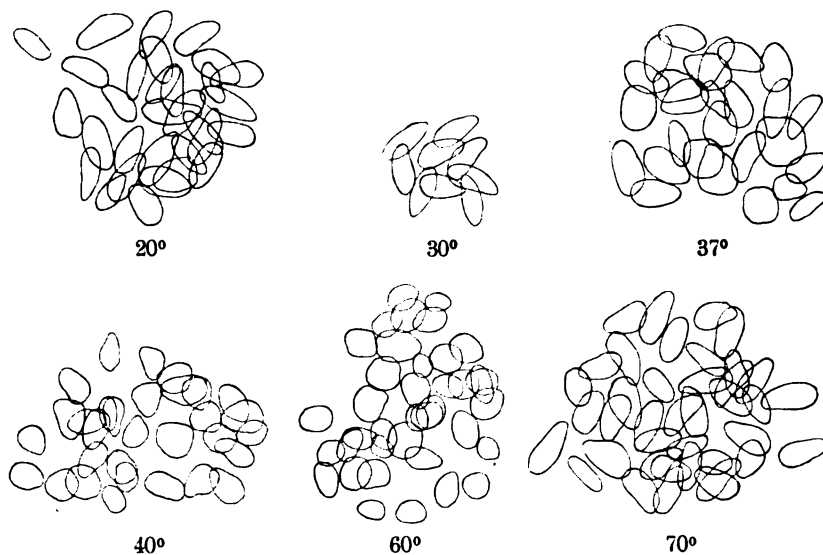
¹⁾ WIL. OSTWALD: Vorlesungen über Naturphilosophie. Leipzig (Veit u. Co.) 1902.

²⁾ Wo. OSTWALD: Grundriß der Kolloidchemie. Dresden 1909.

³⁾ Wo. OSTWALD: Grundriß der Kolloidchemie. Dresden 1909 p. 126 ff.

und Stentorplasmas nicht durch die wohl bestimmte oder bestimm-
bare Oberflächenspannung des Hühnereiweiß oder Äthaliumpasmas
ersetzen dürfen. Indirekt können wir aber über die formenbe-
stimmende Rolle der Oberflächenspannung etwas aussagen, sobald
wir die Protozoen steigenden Temperaturgraden aussetzen —
die positive Oberflächenspannung nimmt ja der Definition gemäß
mit zunehmender Temperatur ab, die negative Oberflächenspannung
nimmt zu. —

Zu diesem Zwecke wurden Heuinfusulkolpidien zentrifugiert, das
überstehende Kulturwasser durch Leitungswasser ersetzt und eine
gleichmäßige Infusorienaufschwemmung hergestellt. Sodann wurden
10 ccm Kolpidienwasser verschiedenen Temperaturgraden — der



Textfig. 1.

Zimmertemperatur 17/18°, 20°, 30°, 37°, 40°, 60°, 70° C auf eine
halbe Stunde ausgesetzt, sofort mikroskopiert und eine größere Zahl
von Kolpidienindividuen wurde mit dem Zeichenapparat Okular 6
Objektiv 3 gezeichnet (Textfig. 1).

Gegenüber höheren Temperaturgraden verhalten sich die In-
fusorien je nach der Art der Kultur sowie der individuellen Resistenz-
unterschiede verschieden, bei 37° C sterben in aufsteigender
Folge einzelne Kolpidien ab, während bei 40° alle Kolpidien aus
den mir zur Verfügung stehenden Kulturen nach einer halben
Stunde tot waren. Jedesmal wurden die Umrisse der einzelnen

Tiere mit dem Zeichenapparat skizziert, ein Unternehmen, das unterhalb 37° C insofern nicht leicht war, als die Tiere durch minimale Bewegungen die Fertigstellung der Konturen störten. Jedenfalls geht aus den Untersuchungen aber hervor, daß bis 37° C die Oberflächenspannung der Kolpidien nicht wesentlich verändert war, daß dagegen nach 40° C infolge der Auflösung der inneren Protoplasmaspannung die langsam absterbenden Infusorien ihre birnenförmige Gestalt einbüßten, und gebläht erschienen. Bei 70° C wurden sie einfach durch die Hitze fixiert und bewahrten wiederum ihre normale Gestalt. Aus diesen Versuchen kann man jedenfalls weder auf eine stetige Zu- noch Abnahme der Oberflächenspannung der Infusorien schließen.

Bei den Kolpidien kommen im präcytostomalen Vorderende Fettgranulationen bzw. fettartige, mit Sudan färbbare Körnchen vor, die bei 20° C ziemlich groß erschienen, um 60° C sich wohl infolge der fehlenden inneren Protoplasmaspannung zu größeren Gebilden später vereinigten. Eine Protoplasmakavulation war von 37—60° C deutlich nachweisbar. Gefärbt boten die Infusorien folgendes Bild dar: Zwischen 30—37° C traten zahlreiche Teilungen auf, wobei der Macronucleus spindelförmig ausgezogen wurde, die Struktur des Protoplasmas war dicht und wabig; um 40° C waren die Infusorien gebläht, der Kern zog sich zu einer dichten Kugel zusammen, im Protoplasma machten sich Kavulationsprozesse bemerkbar. Bei 70° C besaßen die Kolpidien wiederum fast ihre normale Gestalt, nur war das Cytostoma öfters teilweise herausgepreßt. —

Früher ¹⁾ wurde der Versuch gemacht, einen Morphekoeffizienten in dem Sinne aufzustellen, daß die halbe Länge der Normalgestalt des Protozoons in ein Verhältnis zu dem Radius der Protoplasma-kugel desselben Protozoons gesetzt wurde. Auf diese Weise kann man die Morphe wenigstens in einem Sinne zahlenmäßig zum Ausdruck bringen.

Durch verschiedene chemisch-physikalische Zusätze ist man imstande das durch die Morphe geformte Protoplasma auf eine primäre Flüssigkeitskugel zu reduzieren. Bei der Trypanosomenzelle gelingt dieses am besten durch Zusatz von Glycerin ($\frac{1}{2}$ oder Überschuß), das nach ca. $\frac{1}{2}$ —1 Stunde die Mehrzahl der langgestreckten Zellen in runde, kala-azarähnliche Gebilde umwandelt. Leider kann man

¹⁾ Die Morphekonstante $K_m = \frac{V_m}{V_t}$; $V_m:2 =$ die von der Morphe diktierte größte (längste) Begrenzungsdistanz der Zelle, $V_t =$ Radius der reduzierten Protoplasma-kugel. Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig., Bd. 62 1912 p. 281.

die Kugelgebilde im Glycerin nicht scharf unterscheiden und Zusätze von Farben wie Azur II und GIEMSA-Lösung behindern wiederum das Abrunden. Mit Glycerin wurden die verschiedenen Trypanosomen (Nagana, Dourine, Gambiense, Rhodesiense und Mal de caderas) behandelt und ich hoffte wenigstens auf diese Weise die oben diskutierte spezifische Oberflächenspannung bei diesen Protisten bestimmen zu können. Sofern aber die Verschiedenheiten der individuellen Variation, die Wachstumsunterschiede und Stammvariationen berücksichtigt worden sind, konnte diese Methode selbst über die Spezifität der Oberflächenspannung der reduzierten, der Morphe also entkleideten Trypanosomenkugel, nichts aussagen. —

Gegen die Annahme, als ob die Fiktion der „spezifischen“ Oberflächenenergie restlos alle die Erscheinungen, die wir unter dem Begriff der Morphe vereinigen, „erklären“ könnte, dürften aber noch prinzipielle Bedenken geltend gemacht werden¹⁾. Die Oberflächenenergie, die im Grunde genommen nur einen Maßbegriff darstellt, versagt dort, wo das eigentliche Problem — das Neue, die Gestaltung anfängt. — Gewiß kann durch sie im physikalischen Sinne allerlei über die Oberfläche und Spannung eines Plasmatrofens ausgesagt werden, bei hinreichend vertiefter Analyse kann selbst die unbestimmte, variable Gestaltung einer *Amoeba*, bei der jeder Punkt der Oberfläche ein Element des Inneren und umgekehrt werden kann, „erklärt“ werden, die Oberflächenenergie läßt uns aber im Stiche, sobald wir nur die monaxonen Flagellaten morphologisch analysieren. Warum nimmt ferner gerade dieser Plasmatrophen die Gestalt des Trompetentierchens und jener die des Vaucheriafadens an — in diesen Fällen liegen die spezifischen, gestaltenden Strukturen gleichsam der physikalischen Tropfenoberfläche auf und ihre Probleme fangen erst dort an, wo das Messen der Quantitäten und Energieumsätze aufhört. Wie OSTWALD selbst betont, ist der Begriff der Oberflächenenergie nicht hinreichend analysiert und vertieft und wir dürfen also nicht vorzeitig mittels eines derart unfertigen Begriffes das vielleicht Neue, einer weiteren Forschung zugängliche aus der Welt des Anorganischen (Kristalle) und des Organischen eskamotieren. „Die in der Elastizitäts- und Kapillaritätslehre eine messende Rolle spielenden, von OSTWALD so genannten „Volum-“ und „Oberflächenenergien“ reduzieren sich im Grund auf besondere Formen der durch die aufgewendete „Arbeit“ gemessenen potentiellen mechanischen

¹⁾ A. BERTHOUD (Journ. d. Chim. physique 10 1912 Neuchatel) leugnet im Gegensatz zu CURIE bei der Wahl der Kristallform eine erhebliche Beteiligung der Oberflächenenergie.

Energie, deren Kapazitätsfaktor (die Strecke) hier zwei- bzw. dreidimensional wird. — Das eigentlich „Energetische“ ist hier gerade das, was die gegebenen, „wirklichen“ Sonderheiten der Phänomene eher verschleiert als hervortreten läßt“¹⁾ (H. DRIESCH).

Soweit wir derzeit das Problem abzugrenzen imstande sind, begreift die Protistenmorphie eine in der Zeit gewordene, spezifische, intensive Mannigfaltigkeit des organischen Körpers durch die dieser aus jedem Element der Zelle in Hinsicht auf Raum (Zelle) und Zeit (Entwicklung) auf Grund einer reinen, noch auszubauenden Morphologie als Gestaltetes sofort erfaßt werden kann. Wie der Kristallograph aus der graphischen Darstellung der Parameterverhältnisse die Mannigfaltigkeit der Kristalle abliest, so muß in der Zukunft der reine Morphologe aus den Achsenindizes der Protistenzelle die Gestaltung des jedesmaligen Protozoons ablesen können. Den Weg muß uns erst die zu schaffende, reine Morphologie, die sich nicht allein auf phylogenetischen Spekulationen aufbaut, sondern sich auch um die Funktion der Organoide kümmert, weisen.

Ohne noch weiter in diesem Archiv auf den begrifflichen Wert der Morphie einzugehen, soll in den nachfolgenden Ausführungen zunächst diese als etwas „Gegebenes“ angenommen werden und es soll an den Zellen von zwei Protozoen untersucht werden, wie sich die Morphie einigen Einwirkungen der Umwelt gegenüber verhält und welche Zellbestandteile für ihr Bestehen notwendig sind. Für die Versuche sind Trypanosomen (*T. brucei*, *rhodesiense*, *gambiense* und *equinum*) sowie *Stentor coeruleus* ausgewählt worden.

Zunächst wurden die Trypanosomen der Einwirkung verschiedener Solutionen ausgesetzt, dabei die Veränderung ihrer Zellgestalt unter dem Mikroskop verfolgt, sodann wurden Ausstriche oder Tupfpräparate für die GIEMSA-Färbung angefertigt.

Jedesmal wurde eine Normalöse Trypanosomenblut mit einer Öse der Lösung vermischt, gleichzeitig sind dieselben Versuche in Glasröhrchen wiederholt worden.

Verschiedenen Flüssigkeiten gegenüber verhält sich die Trypanosomenzelle verschieden:

1. Bei Zusatz von 1 Proz. Kalilauge löst sich vielfach die Geißel des Trypanosoma unter ständigen Bewegungen in der mittleren Partie des Zelleibes ab, ein Beweis, daß die Geißel ein selbständiges Bewegungsorganell ist (Taf. 5 Fig. 1). Sind zwei Geißeln

¹⁾ H. DRIESCH: Naturbegriffe u. Natururteile. Analyt. Untersuchungen zur reinen u. empirischen Naturwissenschaft. Leipzig 1904 p. 61.

vorhanden (Teilungsstadien), so bewegt sich zuweilen nur die eine Geißel, abermals ein Beleg für die Annahme, daß die Differenzen bereits in der nicht endgültig geteilten Zelle vorhanden sind. Die Morphe bleibt zuerst erhalten, erst später strebt das Plasma der Tropfenform zu und die Zelle nimmt eine Birnengestalt an. Auffallend ist es, daß auch $\frac{1}{2}$ —1 Proz. Salzsäure ähnliche Erscheinungen hervorruft.

Bei Salzsäurezusatz ($\frac{1}{2}$ Proz.; Ngana) löst sich der sodann doppelt so lang werdende Randfaden oft mit seiner undulierenden Membran bandförmig ab, später treten im Verlaufe des Geißelfadens Anschwellungen sowie Bläschen auf (Fig. 2) — ein Beweis, daß dieses Lokomotionsorganell komplizierter gebaut ist und nebst den physiologisch geforderten, eindimensionalen Strukturen noch aus einer den Flüssigkeitsgesetzen folgenden „Zwischen“-substanz besteht. Die physiologisch postulierten Stoffumsetzungen vollziehen sich dann wohl an der Grenze der elastischen, eindimensionalen Strukturen (Fibrillen) und der rigiden Zwischensubstanz.

In GIEMSA-Ausstrichen färben sich derartige Geißeln im Gegensatz zu den Kernsubstanzen etwas im Hämoglobinton, im Protoplasma tauchen zuweilen zahlreiche dunkelrote Körner auf, während die Caryosomsubstanz teilweise der Lösung unterliegt und das Caryosom sich wie ein heller Fleck in dem intensiven Rot des Kernes ausnimmt.

2. Gibt es Substanzen, unter deren Einfluß das Protoplasma der Tropfenform zustrebt, während der für die Morphe wichtige Periplast noch die Form bewahrt — in diesen Fällen ballt sich teilweise das Protoplasma zusammen und der Periplast hängt wie ein Ectosoma des Leucocytozoon dem eigentlichen Körper an (Fig. 3). Die äußere Hülle wird oft klebrig und feine Tuschekörnchen bleiben an ihr haften, ein insofern interessantes Verhalten, als dadurch eine Art von unregelmäßiger Agglomeration sowie die „Attachementerscheinungen“ der Erklärung näher gerückt werden. Diese Erscheinungen werden hauptsächlich bei Zusatz von 3 Proz. Kochsalzlösung beobachtet — in dem Naganaparasiten beginnen in der Plasmablase die Granulationen lebhaft zu tanzen.

3. Existieren Substanzen wie 2 Proz. Natrium bicarbonicum oder noch besser Glycerin pur., die das Protoplasma der Trypanosomen zur Annahme der Tropfenform zwingen, worauf im letzteren Falle die Flagellaten in der Mehrzahl nach kurzer Zeit die Form von Kala-Azarparasiten annehmen; der Blepharoplast wird bei diesem Prozesse nahe an den Zentralkern gerückt. Vielleicht entstehen auf

gleiche Weise die verschiedenfach beschriebenen Latenzstadien und Involutionsformen der Trypanosomen. Die Glycerinbehandlung tötete nicht in allen Fällen die Trypanosomen ab und es konnten mit dem Material noch mit Erfolg Ratten infiziert werden; dagegen ist in den negativen Fällen eine Immunisierung der Ratten nicht gelungen.

Bereits aus diesen Versuchen, die hier nur in Kürze und in ihren wesentlichen Punkten wiedergegeben worden sind, geht hervor, daß unter die Mittel (Vermittlungsfaktoren) der Morphe nicht das flüssige, jederzeit der Tropfengestalt zustrebende Entoplasma zu rechnen ist, daß vielmehr in diesem Sinne der Periplast sowie das aus mindestens zwei Substanzmodifikationen bestehende elastische Lokomotionsorganell, das in die Zelle eingespannt und für diese gleichsam zu lang ist, eine große Rolle spielen. —

Weitere Untersuchungen und Versuche sollten bestimmen, welche Zellbestandteile des Trypanosoma (Plasma, Kern, Blepharoplast, Randfaden, Periplast) für die Morphe notwendig sind:

1. Durch Zusatz von Saponin (5 Proz.) kann zum Teil das lichtbrechende Protoplasma gleichsam ausgelaugt werden, während unabhängig davon noch der Randfaden langsame Bewegungen ausführt und die Trypanosomengestalt bewahrt wird. Das Plasma allein bestimmt demnach die Gestalt nicht in wesentlicher Weise.

2. Bei *Tryp. rhodesiense* gibt es kernlose Formen, die dieselbe Gestalt wie die kernhaltigen Parasiten besitzen (Fig. 5). Die Morphe ist demnach vom Kern unabhängig.

3. Bei dem Nganatryp. und anderen Stämmen kommen natürlich blepharoplastlose Formen vor, die sich ebenso wie blepharoplasthaltige Formen verhalten. Sie entstehen auf die Weise, daß der Blepharoplast bei der Teilung sich nicht mitteilt, während der Randfaden der neuen Geißel aus dem allein geteilten Basalkorn hervorgeht (Fig. 4 u. 6).

4. Die früheren Untersuchungen (Salzsäure, Kalilauge) haben schließlich dargetan, daß die Form des Trypanosoma von der teilweise oder ganz losgelösten Geißel zum Teil unabhängig ist.

Alle diese Beobachtungen sprechen demnach für die Annahme, daß die Trypanosomenmorphe hauptsächlich von dem Periplast der Flagellatenzelle abhängig ist. —

Das nächste Objekt, das in den Bereich dieser Untersuchungen einbezogen worden ist, war *Stentor*.

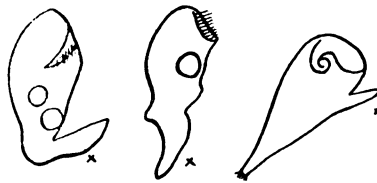
Bringt man vorsichtig mit einer dünn ausgezogenen Kapillare einen Stentor direkt auf die Oberfläche eines hochgespannten, auf

einem fetten Objektträger ruhenden Wassertropfens, so breitet sich das indifferente Protoplasma des Infusors seiner Flüssigkeitsnatur entsprechend nach den Flüssigkeitsgesetzen an der Oberfläche des Tropfens aus und von den formbestimmenden, ständigeren Strukturen bleibt auf der Tropfenfläche nur das Myonemsystem, durch zartere Querrippen noch verbunden, wie eine Skeletthaut des zerflossenen Ciliaten schwimmen. — Bei Zusatz von 4 proz. Natrium taurocholicum, das reines Protoplasma sonst auflöst, blähen sich die zusammengesetzten Stentoren zunächst auf, dagegen bleibt die Membran erhalten, das Entoplasma weicht unter Auflösungserscheinungen von der Peripherie zurück, ballt sich anfänglich zu glänzenden Kugeln, die sich jedoch nicht mit Sudan rotfärben, zusammen und löst sich schließlich vollkommen auf. Die Kerne werden anfangs lichtbrechend, später lösen sie sich gleichfalls auf. Auch diese Versuche sprachen dafür, daß die formbestimmenden Momente in der Pellicula und den Ectoplasmastrukturen zu suchen sind.

Weitere Aufklärung in dieser Richtung verdanken wir den Merotomie- und Regenerationsversuchen. a) Künstliche Elimination des rosenkranzförmigen Kernes führte zu einem Verschluß der Wunde und nach einiger Zeit zu einer annähernden Restitution der Gestalt (Textfig. 2). b) Elimination von größeren Mengen von



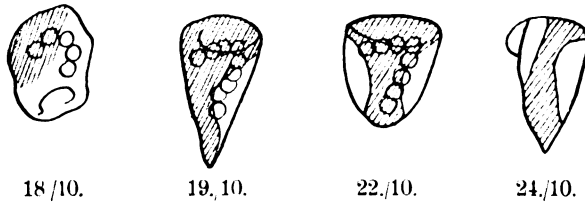
Textfig. 2.



Textfig. 3.

Entoplasma hatte, sofern entsprechende Mengen von Kernsubstanzen noch vorhanden waren, einer Restitution und Regeneration der Stentorenform zur Folge. c) Abenteuerlich herausgerissene Ectoplasmafetzen werden unter dem Einfluß der Morphe entweder eliminiert oder derart verschoben und umgebildet, daß möglichst bald die alte Gestalt erlangt wird. Besonders lehrreich war ein Fall (Textfig. 3), bei dem am 18. Oktober 2^h 15' durch Merotomie große Ecto- und Entoplasmapartien entfernt worden sind, wobei ein Lappen gebildet wurde. Am 19. Oktober besaß dieser *Stentor* seine normale Gestalt, der Lappen stellte seitwärts eine Art von

Tentakel dar. Am 19. Oktober waren 5, 21. Oktober 7, 22. Oktober 11, dagegen am 24. Oktober abends nur 9 Kernglieder nachweisbar. d) Entfernt man durch eine rasche Wasserentziehung, wobei der Tropfen mit dem Versuchstentor abgeflacht wird, große Partien der Infusoroberfläche (Pellicula und Ectoplasma), worauf bei *Stentor coeruleus* das entblößte Entoplasma heller erscheint, so regenerieren die derart ihrer formbestimmenden Außenschichten beraubten Ciliaten nicht mehr ihre typische Gestalt und gehen zugrunde. Bleibt aber ein größeres blaues Pelliculafeld erhalten, so geht von diesem die Regeneration des Stentor aus und zwar selbst dann, wenn man diese Operation mehrmals wiederholt hatte (Textfig. 4. die gestrichelten Partien stellen die jedesmal noch erhaltene Pellicula dar).



Textfig. 4.

Die in dieser Richtung angestellten Versuche: Zerfließungs-experimente, chemisch-physikalische Versuche sowie die Merotomie führten zu dem Ergebnis, daß die formbestimmenden Mittel nicht oder — genauer — wesentlich nicht im Kern oder dem flüssigen Entoplasma sondern hauptsächlich im Ectoplasma im weiteren Sinne des Wortes zu suchen sind. Die Stentormorphe ist zwar nicht in der extensiven Pellicula- und Ectoplasmaschichte, sie offenbart sich aber dort, wo eine bestimmte Menge und Verteilung dieses Protoplasmas vorhanden ist, sie besteht, teilt, regeneriert, reduziert sich unter pathologischen Verhältnissen nur unter der Bedingung, daß bestimmte Teile jenes Plasmas unmittelbar vorhanden sind; erst in zweiter Linie und dann vielleicht nur im physiologischen Sinne sind für diese Morphe das Entoplasma und der Kern notwendig.

II. Zur Frage der Prochromatine und der in der Zelle färbaren Substanzen.

Im Jahre 1908 wurde der Versuch gemacht, auf die Existenz „gewisser“ Prochromatine in der Zelle hinzuweisen, die wahr-

scheinlich lipoidartiger Natur sind und sich auch mit Kernfarbstoffen färben; in diesem Sinne lieferten orientierende Färbungen von Lezithin bereits gewisse positive Resultate. In einer wichtigen Arbeit über die Morphologie des Stoffwechsels bei *Ascaris lumbricoides* weist G. VON KEMNITZ¹⁾ (1912) auf eine mir unzugängliche Studie von FAURÉ-FRÉMIET²⁾ (1910) hin, wo dargetan wird, daß die Färbbarkeit des Lezithins mit Chromatinfarbstoffen von der Fixierflüssigkeit abhängig ist, daß nach einer Fixierung mit Eisensalzen die Affinität zu Hämatoxylin steigt, ja daß es sich nach Behandlung mit Chrom- und Chromosmiumgemischen mit HEIDENHAIN's Eisenhämatoxylin färbt. —

Die früheren Lezithinversuche sind wieder aufgenommen worden nur mit dem Unterschiede, daß diesmal drei Sorten Lezithin und zwar ein mehrere Jahre altes Lezithin, Marke Agfa und Marke „purissimum“ verwendet worden sind.

I. Altes Ovolezithin: Emulsion in Wasser, konserviert nach SCHAUDINN mit Sublimatalkohol, rasches Auswaschen mit 50proz. Alkohol, dann Wasser:

Farbstoff	Technik	Färberesultat
BÖHMER's Hämatoxylin	Färbedauer 1—1½	positive Kernfärbung
HEIDENHAIN's Eisenhämatoxylin	2 Std. Eisenaalaun, 12 Std. Eisenhämatoxylin, Differenzierung	positive Kernfärbung
Alaunkarmin	Färbedauer 1 Std.	rot, einzelne Tropfen gelb
Thionin	Färbedauer 1 Std.	blau
Karbolthionin	Färbedauer 1 Std.	einzelne Tropfen bläulich, rote Trichiten
GIEMSA's Eosinazur	1 Std. Färbedauer behandelt nach der Vorschrift mit Jodalkohol und ½ Proz. Natriumthiosulfat (rasch)	blau mit rötlichem Schimmer, später treten um die Tropfen Niederschlagsmembranen auf, es kommen neben roten Körnchen blaue mitochondrienähnliche Gebilde vor, die sich zu Dendriten aggregieren.
Safranin		in den rötlichen Tropfen entstehen nucleolenartige, dunkelgefärbte Einschlüsse

¹⁾ G. v. KEMNITZ: Die Morphologie des Stoffwechsels bei *Ascaris lumbricoides*. Arch. f. Zellforschung Bd. 7 Heft 4 1912.

²⁾ FAURÉ-FRÉMIET: Arch. de l'Anat. Microscopique T. XI, XII 1910.

Farbstoff	Technik	Färberesultat
Färbung nach BRONDI		rötlicher Grund mit moosgrün gefärbten Tröpfchen, innen feine Ausfällung und Dendriten vgl. GIEMSA-Färbung
Methylenblau		blaue Tropfen, rote Trichiten
Azur I		blaue Tropfen mit Flächenbegrenzung, bei Druck geht die blaue Farbe dieser in Rot über; Trichiten
Azur II		blaue Tropfen, rotes Gerinnsel
Brillantkresylblau		Zwischenflüssigkeit lila, Tropfen blau
Neutralrot		rosa Tropfen, feine braungelbe Körnchen
Bismarckbraun		braun, feiner Niederschlag

Fixierung desselben Lezithins mit Formol (15 Minuten) ergab ähnliche Resultate, nur waren die Tropfen bei der GIEMSA-Färbung blauviolett ohne körniger Ausfällung gefärbt.

Die Fixierung mit FLEMMING'S Gemisch lieferte mit BÖHMER'S Hämatoxylin sowie HEIDENHAIN'S Eisenhämatoxylin schlechte Färbungen, mit Karmin färbten sich die Tropfen braunrot, mit Safranin nahmen die nucleolenartigen Gebilde eine sehr dunkle Färbung an.

II. Lezithin „agfa“; Sublimatalkoholfixierung:

Farbstoff	Resultat der Färbung
BÖHMER'S Hämatoxylin	Tropfen gefärbt wie Chromidien der <i>Arcella</i> ;
Alaunkarmin	gefärbt;
Safranin	roter Niederschlag;
Karbolfuchsin	Fetttropfen, dazwischen rote Kügelchen;
Karbolthionin	keine typische Färbung, kristallinische Ausfällung;
Methylenblau	blaue Tropfen, dazwischen rote Granula;
Brillantkresylblau	blaue Tropfen;
Azur I u. II	blau, rote Komponente ausgefällt;
Neutralrot	rote Tropfen, dazwischen Körnchen;

III. Lezithin purissimum; Sublimataalkoholfixierung.

Farbstoff	Färberesultat
BÖHMER's Hämatoxylin	Kernfärbung;
Karmin	Kernfärbung;
GIEMSA-Färbung	Einzelne Tropfen blau, andere rosa, ferner rote Krümmelkörper;
Karbolfuchsin	rot;
Anilinfuchsin	rot, dazwischen Trichiten, die hohl zu sein scheinen;
Safranin	rote Myelintropfen;
EHRlich-BIONDI-Färbung	Krümmelkörper gelbgrün schwach;
MANN'sche Färbung	Krümmelkörper rot, blaue Massen;
Azur II	blaue Färbung, größere Tropfen kavuliert;

Schließlich wurden die drei Lezithinsorten mit Eiweiß (Hühnerei) vermischt, mit Sublimataalkohol fixiert und mit denselben Farbstoffen behandelt.

Farbstoff	Lezithin pur.	Lezithin agfa	Lezithin alt
BÖHMER's Hämatoxylin	Kernfärbung, Gerinnsel blaß	ebenso	Kernfärbung; Struktur der Chromidien;
Alaunkarmin	rote Tröpfchen und Bläschen	Art Chromidienfärbung	sehr deutlich gefärbt;
GIEMSA-Färbung	rotes Gerinnsel, einzelne blaßviolette Tropfen	ebenso	ebenso einzelne rote Tropfen;
Safranin	rosa Tropfen; Granula	viel Granula	grobes Gerinnsel, rötliche Tropfen;
Anilinfuchsin	rotes Gerinnsel, blasse Tropfen	ebenso, Trichiten	Tropfen und Gerinnsel;
Karbolthionin	blaß violett	blau gefärbt	Tropfen deutliche Kernfärbung;
BIONDI-Färbung	nur rote Gerinnsel-färb.	ebenso	ebenso;
Azur II	blaue kavulierte Tropfen, rotes Gerinnsel	ebenso Gerinnsel blau	grobe violette Wabenstruktur mit blauen Tropfen;
Neutralrot	rot	ebenso	ebenso;
Brilliantkresylblau	kaum gefärbt	ebenso	Wabenwerk mit gefärbten Tropfen;
Methylenblau	blau	ebenso	rötliches Wabenwerk, blaue Tropfen;

Diese Färberesultate belehrten uns, daß es neben den Kernsubstanzen noch chemisch kompliziert zusammengesetzte, bis jetzt nicht rein dargestellte sog. Lipoidsubstanzen, die auch in der Zelle in analoger Zusammensetzung vorkommen können, gibt, die sich ähnlich wie die Kernsubstanzen färben; allerdings verhielten sich die verschiedenen Lezithinmarken der Färbung gegenüber verschieden und die Art ihrer Fixierung war bei der Beurteilung des Färbungseffektes von Bedeutung. Als zusammengesetzte Körper lieferten sie in färberischer Hinsicht ein doppeltes Resultat, indem sich die Grundsubstanz oft anders färbte als die Tröpfchen, Körnchen, Gerinnsel und Ballenkörper.

Jedenfalls können in der Zelle Strukturen vorkommen, die nicht direkt genetisch vom Kern ableitbar sind, es können Substanzen in den Zellen auftreten, aus denen nie unmittelbar Kerne entstehen, die selbst Produkte eines metabolischen Stoffwechsels sind und sich färberisch wie Kernsubstanzen verhalten — diese Beobachtungen gemahnen uns bei der Anwendung des alten Chromidienbegriffes, der in der letzten Zeit so weitgehende Einschränkungen bereits erfahren mußte, zu einer noch erhöhten Vorsicht.

III. Studien über das Chromatin und Chromosomen der Protozoen.

Vergleichende Studien über das Chromatin verschiedener Protozoen führten zu dem Ergebnis, daß die einfachsten chromatischen Strukturelemente meistens Korpuskeln sind, die jedoch in zwei Modifikationen vorkommen: in der einen Form stellen sie homogene Körner oder Körnchen dar, in der zweiten, offenbar aus jener hervorgehenden Phase kavulieren sie zentral und erscheinen als Hohlkörper. S. AWERINZEW hat im Archiv für Protistenkunde 1912, 25. Bd. über analoge Beobachtungen bereits berichtet. Die soliden Körper vermehren sich anscheinend in Diploform und stellen den elementaren Zustand des Chromatins dar. Bei einem noch von SCHAUDINN als *Amoeba globigera* (Fig. 7—12) bestimmten Rhizopoden umgaben die Primärkörner hofförmig das Caryosom, das zuweilen peripher verdrängt und durch ein Sekundärcaryosom ersetzt wurde (Fig. 10). In Fig. 11 nimmt man die Vermehrung der Primärkörner wahr, die zuweilen alle gleichzeitig kavuliert sind (Fig. 8). Sekundär blassen sie ab, und hängen durch fädige Gebilde mit der Kernmembran zusammen (Fig. 9).

Im Protoplasma nimmt man neben den sog. Eiweißkugeln kleinste, kokoide Körper auch im Vermehrungszustand wahr, die

wahrscheinlich symbiotische Parasiten darstellen. Sie haben ungefähr die Größe der Elementarkörper des Vogelepithelioms¹⁾ (Fig. 7, 8).

Bei den Ciliaten treten die Kavulationskörper häufig in dem Macronucleus auf, so bei *Chilodon*, *Glaucoma* und *Anophrys* (BÜTSCHLI (BRONNS Klassen und Ordnungen 1889, S. 1715). Beim *Colpidium* treten in dünnen Schnitten durch den Großkern, in dem u. a. bei der Dunkelfeldbeleuchtung die Chromatinkörper im bläulichen Schimmer zum Vorschein kommen, die Kavulationskörper zentral neben einem zeitweise auftretenden Pseudocaryosom auf, während die soliden Körner vielfach der Kernmembran allein anliegen (Fig. 13, 14).

Die Beziehungen beider Chromatinelemente zueinander kann man bei exconjugierten *Glaucoma*individuen verfolgen, bei denen aus den neuen Micronuclei („Placenten“) die neuen Großkernanlagen rekonstruiert werden.

Hier kann man beobachten, daß die soliden Primärkörner an Zahl abnehmen und durch Kavulationskörner ersetzt werden, die schließlich den ganzen Großkern, der unter Umständen wabig erscheint, erfüllen. Bei manchen Protozoen wie bei *Euglena acus*, bei der im länglichen Kern meist vier Pseudocaryosome vorkommen, konnte keine typische Kavulation der Chromatinkörner nachgewiesen werden. In theoretischer Hinsicht würde ich der Ansicht zuneigen, daß die Primärkörner gewisse Funktionsträger darstellen, die wahrscheinlich unter dem Einfluß von Profermenten kavulieren, zentralwärts sich „verflüssigen“ und derart aktiv werden. —

Die bemerkenswerten Resultate der neueren Chromosomenforschung, die von BARANECKY, BALBIANI, JANSSENS, FARMER und MOORE, BONNEVIE, K. C. SCHNEIDER, VEJDOWSKY²⁾ u. a. m. angebahnt worden ist, ließen es als wünschenswert erscheinen, auch nach diesen sowie analogen Strukturen bei den im Teilungszustand befindlichen Kernen der Protozoen zu fahnden.

Wegen der allgemeinen Kleinheit der Protistenkerne stellten sich allerdings diesem Unternehmen große Schwierigkeiten in den Weg, bis es gelungen ist, teilweise geeignete Untersuchungsobjekte ausfindig zu machen.

¹⁾ Analoge Organismen, die kleiner als die bekannten Coccen sind und sich nach GIEMSA leuchtend rot färben, kommen auch in Heuinfusionen, sowie zuweilen in den Fäces der Schweine vor. Letztere passierten mit kleinen Spirochäten Berkefeldfilter, waren jedoch nicht züchtbar. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf die Schweinepesteinschlüsse vielleicht von Wert.

²⁾ Zugehörige Literatur E. VEJDOWSKY: Zum Problem der Vererbungsträger. Kgl. Böhm. Gesellschaft d. Wissensch. Prag 1911—12.

Mir standen zu diesem Zweck von den Flagellaten (I) drei Arten von Euglenen sowie zwei Trachelomonasarten, von Heliozoen (II) *Actinophrys sol* und von Ciliaten (III) *Glaucoma scintillans* zur Verfügung.

I. Die Kernteilung der Euglenen ist von KEUTEN, STEUER, DANGEARD, HAASE u. a. m. wiederholt untersucht worden.¹⁾

Das Caryosom des *Euglena*-Kernes (Fig. 23—25) in dem keine Chromosomen noch Centriolen bis jetzt nachgewiesen worden sind, teilt sich vollkommen unabhängig von dem peripheren Chromatin durch eine Hantelteilung, wobei die Polenden der Hantel stets voneinander etwas abweichend gestaltet waren. Die Chromosomen umgeben in Parallellagerung das sich teilende „Caryosom“ und sind anfangs etwas gebogen oder gewellt, eine Erscheinung, auf die P. DELLA VALLE²⁾ bei der Beurteilung der Metazoenchromosomen besonderes Gewicht legt.

Eine Spiralstruktur war nur bei *Euglena viridis* andeutungsweise (Fig. 24, 25) vorhanden. Eine Längsteilung wurde ebenso wenig wie von den übrigen Autoren bei *Euglena* beobachtet. Bei einer *Euglena*-Species besaßen dagegen die Chromosomen blasenartige Auftreibungen, die unter Umständen eine Längsteilung vortäuschen könnten (Fig. 22). Bemerkenswerterweise konnte bei den untersuchten Formen die Individualität der Chromosomen lange Zeit verfolgt werden und sie sind selbst in ruhenden Kernen noch als solche erkennbar.

Bereits LAUTERBORN betonte für die *Ceratium*-Kerne, daß bei ihnen keine Mitose vorkommt, da eine achromatische Spindel fehlt und BORGERT³⁾ bezeichnete den Teilungsmodus bei den marinen Ceratien als eine modifizierte mitotische Kernteilung, bei der eine frühzeitige Längsspaltung des Chromosomen auftritt, nur mit dem Unterschied, daß die beiden so entstandenen Spaltheilungen nicht auf die Tochterkerne verteilt werden. Bei der Flagellatengruppe *Euglena-Trachelomonas* bestehen die Chromosomen aus mäßig gewellten

¹⁾ DANGEARD: Recherches sur les Euglénoïens. Le Botaniste 1902.

G. HAASE: Studien über *Euglena sanguinea*. Arch. f. Protistenk. Bd. 20 1910 (dort Literatur).

A. STEUER: Über eine Euglenoide (*Eutreptia*) aus dem Canale grande etc. Arch. f. Protistenk. Bd. 3 1904.

²⁾ Paolo della Valle. La morfologia della cromatina dal punto di vista fisico. Archivio zoolog. italiano S. 6, 1912. Eine wichtige, bemerkenswerte Tatsachen bringende, zusammenfassende Schrift!

³⁾ A. BORGERT: Kern- u. Zellteilung bei marinen *Ceratium*-Arten. Arch. f. Protistenk. Bd. 20 1910.

Chromatinfäden, die sich unabhängig von dem „Caryosom“ ohne Zuhilfenahme eines besonderen Teilungsapparates, wahrscheinlich ohne vorhergehender Längsteilung (*Ceratium*) wie selbständige Organismen der Quere nach durchteilen und selbsttätig polar wandern; in einem gewissen Sinne stellen sie demnach Einheiten dar, denen eine höhere Potenz als den Chromosomen der Metazoenzelle zukommt. Falls man auf die Kernstruktur der Flagellaten bei der Systematik einen besonderen Wert legt, dürfte es zweckmäßig sein, diese Gruppe von den übrigen Flagellaten wie *Anisonema*, *Entosiphon* u. a. schärfer abzutrennen als es üblich ist. —

II. *Actinophrys sol*. Die Entwicklungsgeschichte dieser schönen Heliozoenform ist zuerst von SCHAUDINN¹⁾ enthüllt, von DISTASO²⁾ insofern berichtigt worden, als dieser Autor eine Autogamie nachweisen konnte, während KEYSSELITZ³⁾ den zweiten Richtungskörper entdeckte, sodann die einzelnen Kernstadien genauer studierte und mit getreuen Abbildungen, auf die wir hier wiederholt hinweisen müssen, belegte.

Die mit EH lebhaft sich färbenden Strahlen dieses Heliozoon verlaufen meist bis zu dem Kern und inserieren hier an chromatischen, zuweilen zentral gelichteten Basalelementen, die in der Gestalt eines Belages der Kernmembran anlagern. Trotzdem die Strahlen derart resistent sind, daß sie gebogen, gewellt oder spiralig gedreht werden können, sind sie doch nicht persistent, denn die färbare Achse kann in unregelmäßige Granulationen bzw. Substanzteile zerfallen und schließlich schwinden, so daß nur der plasmatische Pseudopodienstrahl, der zuweilen verzweigt ist, erhalten bleibt (Textfig. 5).

Aus diesem Verhalten erklärt es sich auch, warum einzelne Strahlen mit ihrer geschwärzten Achse nicht bis an die chromatischen Elemente herantreten und warum viele von diesen keine Strahlen besitzen.

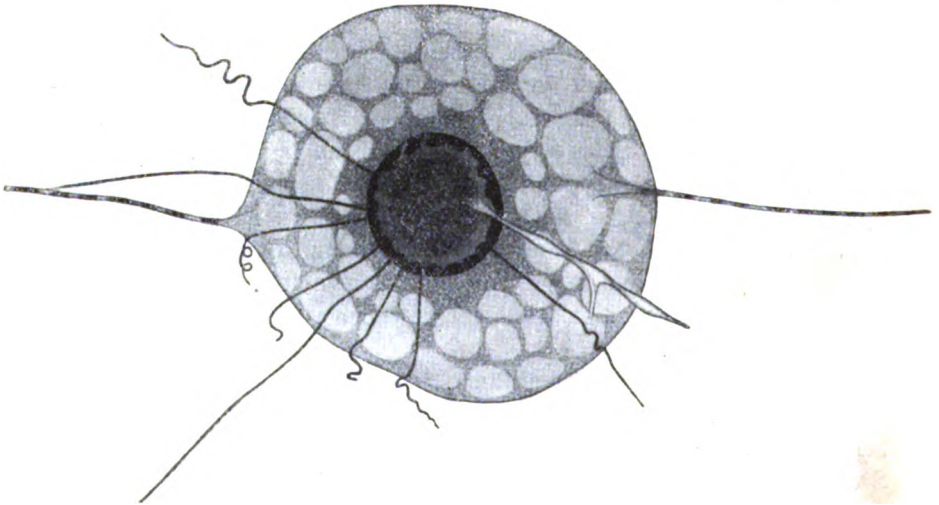
Die chromatischen Elemente können durch eine Art von Chromatingitterwerk (Fig. 26 a) miteinander in Verbindung treten und umschließen bzw. umspinnen im inneren Hohlraum ein granuliertes Netzwerk, das jedoch immer von dem peripheren, stark färbaren Belag unabhängig ist (vgl. KEYSSELITZ). — Die sexuelle Entwicklung

¹⁾ F. SCHAUDINN: Über die Copulation von *Actinophrys sol* EHRBG. Sitz.-Ber. d. kgl. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin 1896.

²⁾ A. DISTASO: Sui processi vegetativi e sull'incistidamento di *Actinophrys sol*. Arch. f. Protistenk. Bd. 12 Heft 3 1908.

³⁾ G. KEYSSELITZ: Studien über Protozoen. Arch. f. Protistenk. Bd. 11 1908. Archiv für Protistenkunde. Bd. XXXI.

nimmt in Kürze dargestellt folgenden Verlauf: Ein einzelnes Individuum bildet eine Art von Cyste, in der sich der Kern teilt, wobei die Kernmembran zunächst nicht aufgelöst wird, die Äquatorialplatte besteht aus Chromosomen, denen polar noch freie Körnchen „ansitzen“ (Fig. 27). In dieser Autogamiecyste treten sodann zwischen den beiden Kernen Vacuolen mit Haufen von lichtbrechenden Körnchen und Tröpfchen auf (Fig. 28), das Chromatin sammelt sich später peripher zu unregelmäßigen Inseln an (Fig. 28, 29), in denen bei guter Differenzierung charakteristische, scharf umschriebene Granula sichtbar werden, während gleichzeitig aus der zentralen Partie fast kristallinisch fibrilläre Strukturen hervorgehen (Fig. 29, 30). Die nächste, von SCHAUDINN als Knäuelstadium aufgefaßte und beschriebene Kernumbildung ist in Fig. 30, 31 dargestellt. Sie besitzt mit den Synapsisstadien der Metazoenzellen eine gewisse Ähnlichkeit. Die Entstehung dieses Knäuelstadiums



Textfig. 5. *Actinophrys sol.*

blieb mir leider unklar und da ich keine Zwischenstadien finden konnte, nehme ich an, daß die Fäden des Knäuels sich ziemlich rasch ausbilden.

Die welligen, oft spiralig gedrehten Fäden, die an der Oberfläche nicht vollkommen eben sind, sitzen vielfach, wenn auch nicht immer den peripheren Chromatinelementen, die sich auch diesmal nicht an dem Chromosomenaufbau beteiligen, an und sind gleichsam im Kerninnern aufgerollten Axopodienstrahlen nicht un-

ähnlich (Fig. 31). Im Kern treten seitlich 1—3 „Nucleolen“ auf, die in der Folge einer Cavulation unterliegen (Fig. 30, 31).

Vor der ersten Reduktion treten an Stelle der langen Kernfäden kürzere, anscheinend gedoppelte, an der Peripherie etwas ausgefrante Chromosomen auf, deren Zahl schätzungsweise mit 18—20 angegeben werden kann — dazwischen liegen wiederum die freien, unabhängigen Chromatinelemente (Fig. 32, 33) (vgl. KEYSSELITZ Taf. 20, Fig. 26, 28, 29, 30), die bei der Spindelbildung polar vor den eigentlichen Chromosomen der Äquatorialplatte liegen (Fig. 34), (KEYSSELITZ Taf. 20, Fig. 28, 29). Vor der darauf folgenden Teilung verkleinert sich der Kern, der Kernsaft wird oft in Form einer Kernvacuole (vgl. *Helix*-Spermatogenese) nach außen eliminiert. Bei *Actinophrys sol* kommen zwei Reduktionsteilungen (KEYSSELITZ) vor, nach der ersten Teilung ist der Kern noch mehr verkleinert und wird von kurzen, gleichmäßig gestalteten Chromosomen erfüllt (Fig. 35, 36). Die letzte Reduktionsteilung unterscheidet sich in ihrem Mechanismus von der ersten Teilung (vgl. DISTASO p. 304). Nach diesen Reifungsteilungen gewinnen die Kerne wiederum ein retikuläres Aussehen und nähern sich in den verschmolzenen Plasmen in der Weise einander, daß der eine Kern zunächst in den anderen eingesenkt erscheint. Fig. 38 stellt eine fertige Autogamiecyste dar; in dem Kern tritt wiederum (Fig. 37) die Sonderung in Rindenschichte und Zentrum deutlich auf, außerdem kann man im Protoplasma chromatische Substanzen nachweisen.

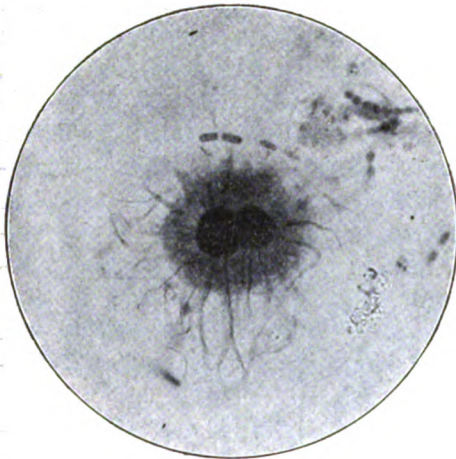
Das Wesentliche dieser Reifungskernteilung ist, daß sehr wahrscheinlich dauernd das Chromatin in zwei voneinander unabhängige Teile getrennt vorkommt: in die sog. peripheren Chromatinelemente, die Bildner der Strahlen und wahrscheinlich auch der Achsenfäden der Chromosomen und in die Chromatinteile, die die eigentliche Chromosomengestalt annehmen. Die Chromosomen sind hier nicht mehr derart selbsttätige Elemente wie bei *Euglena* u. a., da, trotzdem die Kernmembran nicht aufgelöst wird, polar bereits die sog. Strahlenkuppen (*coni di attrazione*) auftreten und sich an der Teilung des Chromatins beteiligen. Immerhin glaube ich alle die fibrillären Differenzierungen innerhalb der Kernmembran auf die eigentliche primäre, endonucleare Chromosomenstruktur zurückführen zu müssen, indem nur im Verlaufe der Entwicklung sich das färbbare Chromatin verkürzte und so die achromatische Achse des Chromatinfadens frei werden ließ.

Nur ein Teil des Chromatins verdichtet sich zu einem am Auf-

bau der Äquatorialplatte sich beteiligenden Chromosom, während etwas weiter von dem eigentlichen Äquatorialring chromatische Körnchen noch sichtbar sind (periphere Chromatinelemente?). —

Neben der Autogamie scheint bei diesem Heliozoon noch eine Kernverschmelzung vorzukommen, wenigstens sind Individuen beobachtet worden, deren Kerne einander in gleich eigenartiger Weise genähert waren wie in der Autogamiecyste (Textfig. 6). Die Strahlen reichten oft nicht bis an die Kerne heran.

Diese Beobachtung weist darauf hin, daß bei den Heliozoen die Autogamie, deren Bedeutung durch die Untersuchungen der letzten Zeit wesentlich eingeschränkt wird, nicht der einzige sexuelle Fortpflanzungsmodus der Heliozoen ist. Auch bei *Plasmodiophora* findet man nicht immer zweikernige Sporencysten und ich fasse bei dieser Form die Autogamie jetzt nur als ein gelegentlich auftretendes Phänomen auf.



Textfig. 6.

III. Infusorien. *Glaucoma scintillans* EHRB. Bereits das Studium der allbekanntesten Kernteilungsbilder der conjugierenden Infusorien, die den Text der grundlegenden Arbeiten von BÜTSCHLI¹⁾

(1876), BALBIANI,²⁾ MAUPAS³⁾ (1886—1889), R. HERTWIG⁴⁾ (1889), CLARA HAMBURGER,⁵⁾ H. PRANDTL,⁶⁾ GARY N. CALKINS und S. W. CULL,⁷⁾ ENRIQUES,⁸⁾ METCALF⁹⁾ u. a. Autoren begleiten, be-

¹⁾ BÜTSCHLI: Studien über d. ersten Entwicklungsvorgänge usw. Abh. d. Senckenberg. naturf. Gesellschaft X 1876.

²⁾ G. BALBIANI: Journ. de la Physiol. Bd. 1 1858 u. 4 1861.

³⁾ E. C. R. MAUPAS: Ac. sc. Paris 1886—88; Arch. de zool. expér. et générale 1888—89.

⁴⁾ R. HERTWIG: Über die Conjugation der Infusorien. Abh. d. kgl. bayr. Akad. der Wissenschaften Klasse II Bd. 17 1889.

⁵⁾ CLARA HAMBURGER: Arch. f. Protistenk. Bd. 4 1904.

⁶⁾ H. PRANDTL: Arch. f. Protistenk. Bd. 7 1906.

⁷⁾ GARY N. CALKINS u. SARA WHITE CULL: Arch. f. Protistenk. Bd. 10 1907.

⁸⁾ P. ENRIQUES: Arch. f. Protistenk. Bd. 9 1907.

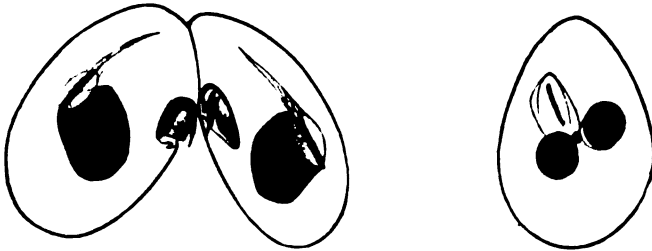
⁹⁾ METCALF: Arch. f. Protistenk. Bd. 13 1909.

lehren uns, daß zwischen der typischen Spindelbildung der Metazoenzellkerne und der der Infusorienzellkerne bei der Conjugation tiefgreifende Unterschiede bestehen:

a) Die Kernmembran schwindet im Gegensatz zu dem Metazoen-nucleus bei den Teilungsvorgängen nicht.

b) Bei vielen Infusorien wird die sog. Zentralspindel nicht wie das Netrum der Metazoenzellen durch Auseinanderweichen der Zentren ausgesponnen, sondern entsteht zunächst einseitig an dem zonal angelagerten Chromatin in Kalotten- oder Conusform.

c) Nach BALBIANI, BÜTSCHLI, HERTWIG, HAMBURGER und CALKINS u. a. nimmt bei einigen Formen der Kern zunächst eine Sichelgestalt an, worauf von dem chromatischen Pol gegen den Macronucleus eine lange Spitze auswächst, so daß zunächst die erste „Spindel“anlage heteropol (heterodynam) ist.



Textfig. 7.

Bei *Glaucoma* wuchsen bei der ersten Conjugationskernteilung des Micronucleus die Fibrillen gleichfalls einseitig stark aus (Textfig. 7) und waren bereits etwas tordiert — erst später scheint sich der Kern zu der typischen Spindelgestalt umzuformen. Die Spindelfasern sind aber in allen diesen Fällen im Gegensatz zu den streng zentrierten Netrumfasern der Vielzelligen viel selbständigere Gebilde, die anfangs nicht einmal zentriert sind und oft tonnenförmig locker nebeneinanderliegen (Taf. 5 Fig. 18) Ähnliche Bilder bringen auch die Arbeiten von BUSCHKIEL¹⁾ (*Ichthyophthirus*) sowie P. ENRIQUES²⁾ zur Darstellung. Vielfach ist diese eigenartige Freiheit der Fasern der Micronucleusspindel darauf zurückzuführen, daß diese Fasern etwas mehr als einfache Netrumfasern sind und in ihrer Gänze (Chromosom im alten Sinne des Wortes und Zentralspindelfaser) mit den frei sich teilenden Hyper-

¹⁾ BUSCHKIEL: Arch. f. Protistenk. Bd. 21 1911.

²⁾ P. ENRIQUES: Arch. f. Protistenk. Bd. 9 1907.

chromosomen der Euglenen und verwandter Flagellaten zu vergleichen sind. Bei der Teilung werden sie auch nicht durch das Auseinanderweichen von gewissen Zentren gleichsam passiv ausgesponnen, sondern sie wachsen aktiv in die Länge und üben auf die nicht genug sich dehrende Kernmembran eine Stemmwirkung aus (R. HERTWIG). Aus diesem Grunde sind auf den späteren Teilungsstadien die Fasern meistens tordiert (*Bursaria*, *Didinium* u. a. m.)

Jedenfalls folgt bereits aus dieser Beobachtung, daß die sog. Zentralspindelfasern und Chromosomen der Micronuclei der Infusorien nicht unmittelbar mit den Netrumfasern und Chromosomen der Metazoenzelle zu vergleichen sind und daß der zwar nach gleichen Zielen zustrebende Teilungsmechanismus der Kerne doch mit verschiedenen Mitteln arbeiten kann.

Tafelerklärung.

Tafel 5.

- Fig. 1. Nganatripanosoma. Einfluß 1proz. Kalilauge. Vergr. 1400.
 Fig. 2. Dasselbe. Veränderungen an der Geißel unter $\frac{1}{2}$ proz. Salzsäure. Vergr. ca. 1400.
 Fig. 3. *Trypanosoma rhodesiense* in 1proz. Kochsalzlösung und Tuschezusatz. Vergr. 1400.
 Fig. 4. Mal de caderastrypanosoma. Genese der blepharoplastlosen Individuen. Vergr. 1400.
 Fig. 5. *Tryp. rhodesiense*. Kernlose Form. Vergr. 1400.
 Fig. 6. Nganatripanosoma. Blepharoplastlose Form, sowie eine Form mit terminalem B. Vergr. 1400.
 Fig. 7—12. *Amoeba globigera* SCHAUDINN. Vergr. 1400.
 Fig. 7, 8, 12. Kavulation der Chromatinkörner.
 Fig. 13 u. 14. Hauptkern von *Colpidium*. Schnitte. Pseudocaryosom; sowie beide Chromatinformationen. E.-H. Vergr. 1400.
 Fig. 15. Exconjugant von *Glaucoma*.
 Fig. 16. Normales Individuum von *Glaucoma*. Vergr. 1400.
 Fig. 17. *Anophrys*.
 Fig. 18. Conjugation von *Glaucoma scintillans*. Vergr. 1400.
 Fig. 19 u. 20. *Trachelomonas*. Vergr. 1500.
 Fig. 21 u. 22. *Euglena* spec. Vergr. 1500.
 Fig. 23—25. *Euglena viridis*. Vergr. 1400.
 Fig. 23. Kern in schiefer Lagerung.
 Fig. 24. Leichte Spiralstruktur der Chromosomen.
 Fig. 26—38. *Actinophrys sol.* Mit Ausnahme von Fig. 28 (Vergr. 1000) alle Fig. Vergr. ca. 1500.

- Fig. 26. a Oberflächen-, b Tiefenstruktur des Kernes.
 - Fig. 27. Erste Teilung des Autogamieindividuum.
 - Fig. 28. Autogamiezygote.
 - Fig. 29. Kern derselben.
 - Fig. 30, 31. Knäuelstadium.
 - Fig. 32, 33. Vor der ersten Reduktionsteilung.
 - Fig. 34. Erste Reduktionsspindel.
 - Fig. 35. Vor der zweiten Reduktionsteilung.
 - Fig. 36. Zweite Reduktionsteilung.
 - Fig. 37. Autogamie.
 - Fig. 38. Cyste nach der Autogamie.
-

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten Hamburg.
Leiter: Prof. Nocht.)

Aus dem Nachlaß von FRITZ SCHAUDINN.

Von

S. v. Prowazek.

(Hierzu Tafel 6 u. 7.)

In der Sammlung von Präparaten aus dem Nachlaß SCHAUDINN's fanden sich einige sehr interessante Protozoenformen, deren Bearbeitung ich in der Hoffnung, weiteres Material zu erhalten, für spätere Zeiten aufgehoben habe; leider hat sich diese Hoffnung nicht erfüllt und so übergebe ich eine Beschreibung dieser Formen der Öffentlichkeit mit der Bemerkung, daß es sich dabei um eine Kombination von fixierten Stadien handelt, ein Vorgehen, dem stets eine Unsicherheit anhaften wird. Das Material (Süßwasser) enthielt in erster Linie verschiedene Mastigamöben sowie einen zweikernigen Organismus, dessen systematische Messung noch unklar ist.

I. *Mastigella vitrea* (GOLDSCHMIDT).¹⁾

Das Präparat, das diese Form enthielt, ist Herrn Prof. GOLDSCHMIDT (München) zur Beurteilung eingesendet und von ihm als *Mastigella vitrea* bestimmt worden.

Begeißelte Mastigellen waren in dem Präparat sehr selten. Die beobachteten Individuen waren durchschnittlich kleiner als die GOLD-

¹⁾ R. GOLDSCHMIDT: Lebensgeschichte der Mastigamöben. Arch. f. Protistenk. Supplement I 1907.

SCHMIDT zuerst beschrieben hatte, auch konnte ich die Klebkörner in ihrer typischen Ausbildung nicht feststellen.

Neben dem bläschenförmigen, ovalen oder runden Kern, der in gepreßten Individuen innerhalb des Caryosoms ein Centriol (Fig. 2) erkennen läßt, liegt fast immer ein Haufen mit EH gefärbter, körniger Substanz, die mit den Chromidien (Sporetien) GOLDSCHMIDT's identisch ist und mit größter Wahrscheinlichkeit aus dem Kern stammt.

Es sind Kernstadien beobachtet worden, bei denen sich die gleichartig gefärbte Kernsubstanz gleichzeitig sowohl im Kernhohlraum als auch bereits im Protoplasma vorfand (Fig. 3). Bei den sog. Geschlechtstieren treten innerhalb des Chromidiums kleine Zellkerne neben dem großen vegetativen Kern auf, deren Zahl stetig zunimmt. Über die Genese dieser Kerne kann ich nicht mehr als GOLDSCHMIDT aussagen; jedesmal waren in dem „Chromidium“ ein bis zwei abgesonderte Kerne bereits nachweisbar, die erst sekundär einer Vermehrung unterlagen.

In dem Präparat kam auch eine typische Mastigellacyste, wie sie GOLDSCHMIDT beschrieben hatte, vor, daneben sind zwei Arten von Flagellatenformen, die als Macro- und Microgameten gedeutet worden sind, beobachtet worden. Im allgemeinen konnte durch das Präparat SCHAUDINN's, das jetzt ca. 13 Jahre alt, das Tatsächliche der von manchen Seiten umstrittenen Beobachtungen von GOLDSCHMIDT bestätigt werden, bzw. hat SCHAUDINN unabhängig von GOLDSCHMIDT mit großer Wahrscheinlichkeit dieselben Stadien in seinem Präparat gesehen.

II. *Mastigamoeba aspera* F. E. SCH.¹⁾

Das Vorderende dieser sehr schönen, selten beobachteten *Mastigamoeba* ist beim Kriechen verlängert, die nicht übermäßig lange Geißel entspringt aus einem Geißelkern, der eigentlich ein Blepharoplast ist, die Pseudopodien sind fingerförmig. In dem Protoplasma sind so gut wie keine größeren Ingesta beobachtet worden. Auf den vegetativen Entwicklungsstadien kommen meist zwei Kerne vor, die insofern einer Arbeitsteilung oder Differenzierung unterliegen, als nur aus dem einen, dann meist birnförmig gestalteten Kern die Geißel entspringt. Das Caryosom ist von einer Kernsaftzone mit chromatischen Körnchen umgeben; im Innern des Caryosoms kommt oft noch durch eine helle Zone getrennt ein

¹⁾ Bestimmt nach GOLDSCHMIDT's Bestimmungstabelle; in manchen Punkten stimmt diese Form mit älteren Beschreibungen nicht überein.

Centriol (zuweilen Diplosom) zum Vorschein, von dem gegen das gedoppelte Basalkorn der caryogenen Geißel eine Fibrille verläuft, die als ein endonuclearer Rhizoplast anzusprechen ist. Oft liegt dieser Fibrille noch ein Granulum an. Neben diesen zweikernigen Formen treten aber auch einkernige Individuen auf, die durch eine Kernteilung die zweikernigen Formen aus sich hervorgehen lassen. Das Caryosom scheint sich dann promitotisch zu teilen, leider waren die diesbezüglichen Bilder recht spärlich nachweisbar (Fig. 11 u. 12).

Fig. 14 bezieht sich auf eine öfters beobachtete vegetative Mehrfachteilung (schizogonische Teilung), dagegen sind daneben Individuen mit zwei Arten von Kernen konstatiert worden, die ich als Macro- und Microgametocyten deuten möchte. In der einen Art von Amöben waren die Kerne caryosomlos, eiförmig, das Chromatin war in eigenartiger Weise an der Peripherie verteilt, eine Andeutung einer caryogenen Geißel (Fig. 17—18) sowie Teilungsstadien dieser waren vorhanden.

In der anderen Art von Mastigamöben waren die Kerne klein, bläschenförmig und vermehrten sich lebhaft (Fig. 15, 16).

III. *Mastigamoeba acanthophora* n. sp.

Diese *Mastigamoeba* ist nur in wenigen Exemplaren beobachtet worden; ihr Körper ist sphärisch und an der gesamten Oberfläche mit Protoplasmastacheln, deren Niederschlagsmembran dünner ist, besetzt (Fig. 24). Der Kern ist chromatinreich, färbt sich mit EH schwarz und birgt im Inneren ein Caryosom. Die bandförmige Geißel ist an der Basis zwiebelförmig erweitert und hängt mit der derberen Niederschlagsmembran des Körpers durch eine Art von Perforatorium zusammen. Zwischen dieser Struktur und dem Kern ist meist ein Haufen schwarzer Granulationen sowie einer Andeutung von Filarstrukturen nachweisbar.

IV. *Mastigamoeba gigantea* n. sp.

Die *Mastigamoeba gigantea* n. sp. ist wohl die größte flagellate Amöbe mit caryogener Geißel; die Pseudopodien sind lappenförmig, der Kern sphärisch. Im Inneren des Kernes ist eine Platinansammlung sichtbar, während das Chromatin in derber Ballenform an der Peripherie zerstreut ist. Fig. 23 stellt ein Vermehrungsstadium dar; die Kerne sind sehr scharf umschrieben und imponierten anfangs als Fremdkörper.

Diplocaryozoon Schaudinni n. sp.

Dieser merkwürdige Organismus, der nach den Präparatnotizen bereits von SCHAUDINN eingehender studiert worden ist, entstammte einer Süßwasserinfusion und war auf den meisten Stadien zweikernig. Die beiden Kerne differenzierten sich aber in sehr eigenartiger Weise, indem der eine Kern sein bläschenförmiges Aussehen und seine Strukturen wie das Caryosom, peripheres, körniges Chromatin und die Kernmembran beibehielt, wogegen der andere Kern sich zu einem polymorphen, veränderlichen Gebilde umwandelte und auf gewissen Stadien einem Macronucleus eines Ciliaten nicht unähnlich war, so daß man geneigt wäre, die Ciliaten von diesem amöbenähnlichen Organismus abzuleiten.

Es kamen aber auch einkernige Formen mit Kernvermehrung, sowie zweikernige Amöben mit gleichen Kernen vor. Ferner sind Stadien beobachtet worden, bei denen sich der eine Kern stark vergrößerte, während das Chromatin mehr an die Peripherie gedrängt wurde. Schließlich unterlagen die beiden Kernsubstanzen einem Durchmischungsprozeß und der mannigfach gestaltete Kern nahm eine luphaähnliche Struktur an.

In vielen Fällen war er von einem faserigen Netzwerk umspinnen, während daneben Stadien beobachtet worden sind, bei denen die färbare Substanz tropfenförmig cavulierte (Taf. 7 Fig. 4—6) und auch in Tröpfchengestalt in das Protoplasma übertrat. Es kamen auch Organismen vor, bei denen der bläschenförmige Kern degenerierte (Fig. 6 u. 7), so daß schließlich Formen mit nur einem netzförmigen Kern zurückblieben. Neben den Kernen war in den meisten Organismen eine lokale Ansammlung von mit Hämatoxylin färbaren Kriställchen nachweisbar (Taf. 7 Fig. 1, 2, 4, 5).

Diese Organismen sind echte Heteroplastiden, deren Vermehrung durch Teilung vor sich geht (Fig. 1, 2). Das zuerst einkernige Individuum gewinnt durch einen Teilungsvorgang zunächst zwei homodynamische Kerne, von denen sich aber bald der eine Kern unter Auflösung des Caryosoms, Veränderung der Gestalt und Hypertrophie zu einem äußerst plastischen, formveränderlichen, macronucleusartigen Kerngebilde umwandelt.

Diffugia lucida PENARD. var. *minima*.¹⁾

In einem Präparat sind zahllose Individuen einer Varietät der *Diffugia lucida* PENARD beobachtet worden, die sich im Gegensatz

¹⁾ E. PENARD: Faune rhizopodique du Bassin du Léman. Genève 1902.

zu der Stammform (50—60 μ lang) durch ihre Kleinheit (35—40 μ) sowie durch den Aufbau der Schalen, die durchweg aus Diatomeen bestanden, unterschied. Chromidien sind nicht festgestellt worden. In dem Caryosom des bläschenförmigen Kernes kam zuweilen ein centriolenartiges Granulum vor. In dem Material sind schizogonische Vermehrungsstadien (Fig. 9) sowie Cysten (Fig. 10) nachgewiesen worden — öfters sind die Protozoen von Vampyrelliden überfallen und aufgezehrt worden, worauf sich die Parasiten in der Schale der Difflogie encystierten.

Tafelerklärung.

Tafel 6.

- Fig. 1—9. *Mastigella vitrea* GOLDSCHMIDT. Vergr. ca. 1400.
 Fig. 1. Teilung des Kernes.
 Fig. 2—5. Ausbildung des sog. Chromidiums.
 Fig. 6—8. Innerhalb des Chromidiums treten kleine Zellen auf, die als Geschlechtszellen angesehen werden.
 Fig. 9. Die beiden Differenzierungen dieser freigewordenen Zellen.
 Fig. 10—19. *Mastigamoeba aspera* SCH. Vergr. ca. 1400.
 Fig. 10—12. Einkernige Stadien.
 Fig. 13. Zweikernige Stadien.
 Fig. 14. Vermehrungsform.
 Fig. 15—19. Differente, wahrscheinlich sexuell differenzierte Formen. Fig. 15—16 ($\sigma^?$). Fig. 17—19 ($\varphi^?$).
 Fig. 20—23. *Mastigamoeba gigantea* n. sp. (Fig. 20 u. 21 Vergr. 1400, Fig. 23 Vergr. 500.)
 Fig. 24. *Mastigamoeba acanthophora* n. sp.

Tafel 7.

- Fig. 1—7. *Diplocaryozoon schaudinni*. Vergr. 1400.
 Fig. 1. Kernteilung.
 Fig. 2. Stadien mit zwei Hauptkernen und einem Nebenkern.
 Fig. 3. Entstehung der beiden Kerndifferenzen.
 Fig. 4. Degeneration des Hauptkernes.
 Fig. 5. Ausbildung der beiden Kerne.
 Fig. 6 u. 7. Stadien mit dem Nebenkern allein.
 Fig. 8—10. *Difflogia lucida* PENLAND variet. *minima*. Vergr. 1400.
 Fig. 9. Schizogonie.
 Fig. 10. Cystenbildung.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Studies on the Biology of an Amoeba of the Limax Group.

***Vahlkampfia* sp. No. I.**

By

Wm. B. Wherry, M. D., Cincinnati, Ohio, U. S. A.

(From the Laboratory of the Cincinnati Hospital, and from the Marine Biological
Laboratory, Wood's Hole, Mass.)

With Plate 8 and 9 and 8 Text figures.

Introduction.

In February 1909, I isolated an amoeba from the water supply of Oakland, California, by utilizing 0,5 per cent broth followed by plating in Musgrave and Clegg's medium. (For the sake of brevity this medium will be referred to as — 1 agar.) After a number of attempts, a single well isolated amoeba was successfully transferred by means of a very small platinum loop. It was found to be in symbiosis with a single species of bacillus, i. e., many platings and cultural studies seemed to show that the bacillus was in pure culture. A subculture of the above „pure-mixed culture“ made in February, 1909, was kept sealed with a rubber cap and transplants from this culture were made in October 1911 when the following study was begun. At this time, by the use of the aniline — black dark field, as recommended by Dr. CHAS. GOOSMANN certain peculiar spirilla were found to be also present in the transplants on — 1 agar. These as well as the symbiotic bacillus will be described below.

My work was started with the idea of investigating the physical and chemical conditions necessary for the growth of this particular amoeba. When, in the course of the work, it was discovered that the trophozoites had the ability to turn, apparently at will, into actively motile flagellated forms, my efforts were directed mainly towards investigating, (a) the effects of varying environment upon the morphology and development of the amoeba, and (b) the conditions which lead to the production of flagellated forms.

In reviewing the literature accessible to me on the cultivation of amoebae I was impressed chiefly by the facts, that all the so-called species had been studied for comparatively short periods of time; that most of the descriptions were from cultures grown on — 1 agar; that little attention had been given to the influence of the symbiotic bacteria — in fact, often the species were unknown — or to the possible influence of an otherwise varied environment upon the morphology and mode of multiplication of the amoebae.

While this paper is a summary of almost daily observations made during a year, I do not feel that it represents more than a beginning towards an insight into the life history of a single species. This species, when studied upon — 1 agar or in diluted broth cultures, corresponds exactly with the free living amoebae for which CHATTON and LALUNG-BONNAIRE (1912) created the new genus *Vahlkampfia* in honor of E. VAHLKAMPF “who was the first to make known the characteristic mitosis of these amoebae”. (For Synonymy, see CHATTON, 1912).¹⁾

According to ALEXEIEFF a considerable number of distinct species have been confounded under the specific name *Amoeba limax*, DUJARDIN, on account of insufficient study. Habitat has nothing to do with specificity. The members of this group are cosmopolitan and able to live wherever there are bacteria. They progress, as a rule, by means of a single large pseudopod but may, under some conditions, protrude many spinous or many finger-shaped pseudopodia. As a rule the ectoplasm is not visible when the trophozoites are at rest. A pulsating vacuole is present in the endoplasm.

¹⁾ After this article was printed my attention was called to a valuable article on “Genera and Species of Amoeba” by Prof GARY N. CALKINS (Trans. 15th Internat. Cong. on Hygiene and Demography, held at Washington, D. C. Sept. 1912) who thinks it advisable to retain ALEXEIEFF's generic name *Nägleria* for those members of the group which have been proven to have a flagellated stage, and to retain the generic name *Vahlkampfia* provisionally for the rest of the members of the “*limax*” group.

In the genus *Vahlkampfia*, the nucleus is single.¹⁾ It is characterized by a voluminous karyosome, with or without a centriole, dense and chromophilic, poor in peripheral chromatin (protocaryon). Nuclear division is by promitosis (NÄGLER, 1909) in which the peripheral chromatin is enriched by granules derived from the karyosome and characterized by the formation of voluminous polar bodies derived from the karyosome and the formation of an equatorial plate which is formed principally or wholly of peripheral chromatin.

With slight variations the promitosis exhibited by the members of the limax group is said to be quite constant. The cysts are always uninucleated. Here the karyosome is much smaller than in the trophozoit stage the cystic variation of the karyosome (HARTMANN)]. They show certain ornaments, the "corpuscles chromatoides", which disappear in the old cysts.

The trophozoits are capable of passing into a flagellated stage when they have two flagella. Type species *Vahlkampfia limax* (DUJ., emend CHATTON and LALUNG-BONNAIRE). There are, among others, *Amoeba limax* of VAHLKAMPF; *A. poedophthora* CAULLERY; *A. froschi* HARTMANN; *A. spinifera* NÄGLER; *A. lacertae* HARTMANN; *A. lacustris* NÄGLER; *A. diplomitotica* BEAUREPAIRE ARAGAO; *A. mucicola* CHATTON; *A. Hartmanni* NÄGLER; *A. punctata* DANGEARD, the straw amoebae of WASIEWLEWSKY and HIRSCHFELD, etc.

It is generally believed that the nucleus is the least variable structure in the cell. In a comparative study of the stained preparations of my amoeba, no variations of a striking character were encountered so far as the mode of nuclear division is concerned. However, as I did not find a satisfactory method of inducing mitosis until the latter part of the year, most of the preparations were characterized by a lack or scarcity of mitoses. It appears certain though that the stages of promitosis are the same whether the amoeba is grown on — 1 agar or in hen's ovomucoid with yolk. As will be seen below, environment has a great deal to do with determining the size and number of the nuclei, and the number of nuclei which may be found to be undergoing mitosis simultaneously. Further, environment determines the occurrence of other types of multiplication e. g. by endogenous budding; the formation of multi-

¹⁾ ALEXEIEFF believes it is advantageous to hold, at least provisionally, to the generic name *Sappina* DANGEARD, for the binucleated forms, *S. pedata* DANGEARD, *S. (Amoeba) Hartmanni* and NÄGLER. It will be seen from my work that the number of nuclei and the number of mitoses may vary enormously.

nucleated cysts; and the formation of binucleated flagellated forms equipped with four flagella. All these additional characters must be added to those already ascribed to the genus *Vahlkampfia*. Moreover the presence or absence of large cytoplasmic granules, plastids, is shown to be of no specific value but a result of nutrition. The marked variations in the type of pseudopodia encountered in a single species only serves to emphasize anew what is usually held by students of this group, namely, that they have no specific value. The creation of specific names based on such morphologic characters, e. g. as in *A. tachypodia*, *A. lamellipodia*, *A. platypodia* (GLÄSER) and *A. lobospinosa* (CRAIG), only creates confusion.

The Symbiotic Bacillus.

It is about the size of *B. typhosus*; is actively motile, especially so when in contact with free oxygen; is non-sporogenic and non-chromogenic; it produces no visible change in the ordinary culture media, broth, agar, gelatin, potato, excepting alkali production; it coagulates milk after 30 days without the production of acid; it does not ferment dextrose, lactose, maltose, saccharose and mannite; it produces tyrosinase. It stains readily with the ordinary aniline dyes; is not acid and alcohol proof and does not retain the stain in GRAM's method. It grows well at 18° C. and at 37° C.

The Associated Spirillum.

This peculiar spirillum is found with difficulty in young cultures on — 1 agar. They are fairly numerous after 30 days growth at 18°—24° C. The — 1 agar slants were kept tightly capped with rubber in order to preserve the condensation water. In a loopful of this water the spirilla could be seen plainly. They vary from 4 μ to 8 μ in length and from about 0,5 μ to less than that in diameter. Some of them are twice as thick as others. No signs of transverse division are seen but occasionally two very thin spirals partially united at one end are found and this suggests that they divide by longitudinal division. As a rule the amplitude of the spirals is greatest in the middle portion where it is approximately 1 μ . The turns taper off at each end giving the whole spirillum a fusiform appearance (Plate 8, α , β , γ).

When examined in the fresh state, the summits of the waves appear sharply pointed and the down stroke to the right appears

thicker than the up stroke. This is apparently a diffraction effect for when they are mounted in diluted LÖFFLER's methylene blue, the stained spirals appear as evenly rounded and as true spirals as those of a corkscrew. They show no signs of flexibility nor of motility. They do not retain the stain in GRAM's method, nor in the tubercle method; nor do they stain well with GIEMSA's stain. Attempts to obtain good stained preparations met with indifferent results.

Various attempts to isolate them in pure culture failed, nor would they multiply with the above symbiotic bacillus under conditions where the amoebae failed to grow. This state of apparent symbiosis is interesting since this spirillum is apparently identical with, or at least very similar to, that described by SALOMON. This worker amplified the previous work of BIZZOZERO who first discovered the spirillum as a constant inhabitant of the dog's stomach. SALOMON found it constantly in the stomach of the dog, cat, rat, man, monkey, cow, pig, squirrel, guinea pig, rabbit, white mouse, grey mouse, field mouse and mole. He did not find it in birds. He was not able to cultivate it. The forms he described (α , β , γ) correspond in size, staining and morphology with the three forms pictured by me.

It should be mentioned that GAUDUCHEAU has described the occurrence of spirilla-like bodies in cultures of "*Entamoeba phagocytoides*". These varied from the limits of visibility to 100 μ in length, and greatly in diameter. They only could be found when the amoeba was grown in symbiosis with motile bacteria. The young forms could only be demonstrated by a flagella stain but the older forms stained much more readily. He concluded that they were formed by the fusion of cast off bacterial flagella and that they were identical with the giant cilia previously described by LÖFFLER and by Novy.

The Nutrition of *Vahlkampfia* sp. No. I.

Growth is luxuriant on — 1 agar. The growth here is greatly enhanced by the addition of 1 c. c. of $\frac{N}{20}$ K Cl to each 7 or 10 c. c. of the medium.¹⁾

On this medium the trophozoits wander extensively from the point of inoculation and carry the symbiotic bacteria with them.

¹⁾ This latter observations was made by Mr. WADE W. OLIVER who worked with me during some of the earlier studies.

Attempts were made to prepare synthetic solid and fluid media with the following results: The amoeba and its symbiotic bacillus grows very well upon 2 per cent agar agar made up with redistilled water. However, the amoebae multiply much more rapidly if the agar solution has been cleared with egg white. This is undoubtedly due to the fact that some ovomucoid, or some of its constituents, has been added to the agar.

Another important point is brought out by the use of uncleared and cleared agar. While the amoebae multiply very well upon the uncleared agar, they do not wander beyond the edges of the area over which the bacteria have spread — in fact, they may be found massed by the hundreds at such an edge. On the other hand, if the agar has been cleared they wander out far beyond the edges of the bacterial growth. Attempts to transplant these wanderers show that they are unaccompanied by the symbiotic bacillus. Thus one may pick off amoebae free from bacteria by employing this medium. This has been noted by ANNA WILLIAMS (1911, p. 269), who used nutrient agar, but apparently the real reason why the amoebae may pass beyond the edge of the bacterial growth has not been appreciated. My attempts to grow this species without bacteria failed, although it must be said that the tissue smear method of ANNA WILLIAMS was hardly given a fair trial. This amoeba is apparently dependent on some of the products of bacterial activity which diffuse out for some distance into the agar agar. Phagocytosis has not been a prominent factor in the nutrition of this amoeba although occasionally large numbers of bacteria are taken up under conditions which have not yet been analyzed.

In connection with the following experiments it is to be noted that BELJERINCK (1896) studied the growth of certain amoebae, from soil, on washed agar treated with certain salts, and that SÖHNGEN (1905) observed a rich growth of amoebae and flagellates, from soil, along with *B. methanicus* in a medium of salts where ammonium salts were the only source of nitrogen and methan the only source of carbon. The protozoa here were dependent wholly upon the accompanying bacteria.

The effect of removing certain ingredients from agar was determined by soaking it repeatedly in changes of redistilled water over a period of three weeks at 9°—12° C. When a 2 per cent solution of this agar was inoculated there was no multiplication of the trophozoites and cysts, nor of the symbiotic bacillus. Then the salts removed from the agar were replaced by adding to 100 c. c.

of the 2 per cent washed agar solution, CaCl_2 , 0,01 gm.; MgSO_4 , 0,006 gm.; Na_2SO_4 , 0,01 gm.; NaCl , 0,002 gm.; Na_2CO_3 , 0,002 gm.; and KCl , 0,004 gm. The combination of anions and kations was empirical but the quantities were based on the ash analyses of Whittaker. Upon this medium the amoebae and bacteria grew and multiplied, though not as well as upon the untreated agar. When 50 times the above quantity of salts were added, the bacteria flourished but the amoebae did not multiply. It should be noted that in addition to the carbohydrate, cellulose and mineral matter, agar contains from 1—3 per cent of crude proteins of undetermined nature. That the latter are removed by washing may be inferred from the work of BEIJERINCK who was able to grow the nitrifying bacteria upon washed agar.

Neither the amoeba nor the symbiotic bacillus grew (23° and 37°) when the above salts in solution were enriched by the separate addition of leucin, tyrosin, glycol (0,08 per cent), asparagin (0,04 per cent); or by a mixture of the above amino acids and asparagin. Nor would they grow in a diluted USCHINSKY'S fluid, even though accompanied by *B. pyocyaneus* which flourished there.

But both bacteria and trophozoits flourished when the above salt mixture contained 0,4 per cent WITTE'S peptone.

Another series of experiments in which hen's eggwhite was boiled in neutral, acid and alkaline distilled water showed that crude ovomucoid was a most favorable medium for this amoeba. This has been prepared by boiling the whites of three eggs thoroughly mixed with 200 c. c. of distilled water, filtering and tubing the filtrate which was then sterilized on three successive days in flowing steam or in the autoclave at 127°C . It was found that the addition of a loopful or two of the yolk of the egg, before sterilization, to each tube containing 5 c. c. of the ovomucoid favored the development of the trophozoits and of the flagellated forms. Further, in such a medium, the amoebae continue to proliferate for weeks forming a thick scum on the surface of undisturbed tubes and incredible numbers may be picked off in a loopful from such a culture. (Plate 8, Fig. 1.) On the other hand, active multiplication ceases in about a week in plain ovomucoid and soon the trophozoits tend to disappear — the cysts falling to the bottom of the test tube.¹⁾

¹⁾ I find that GRÄSER (1912 p. 31) states that he used „Hühnereiweiß mit Wasser“ as culture media and states that it is not new for one finds in the Book by BEHLA (BEHLA, R.). Die Amöben, insbesondere vom parasitären und kulturellen Standpunkte, Berlin 1898) that „Balsamo Crivelli und Maggi kultivierten auf einem

There is no question in my mind that the addition of egg yolk to ovomucoid was responsible for many of the findings detailed below, notably the production of multinucleated forms which probably arise by repeated amitosis favored by the reduced oxygen tension which is produced by the surface scum; whereas, as will be shown below, a free supply of oxygen favors and induces division of the nucleus by mitosis, and also division of the cytoplasm.

Throughout the cultivation experiments, the amoebae were studied in the living unstained condition and unless otherwise mentioned were examined in the culture fluid itself. Towards the end of the year some vital stains were used. Wet fixation in saturated bichloride of mercury and acetic followed by staining in HEIDENHAIN'S iron-alum haematoxylin was used almost exclusively in preparing the permanent specimens. These were used in a comparative study where attention was directed chiefly to the form, structure, mode of division, number and size of the nuclei; to the presence or absence of endogenous budding; and to the presence or absence of multiplication within the cysts.

Description of the Amoeba.

I. The Trophozoits.

The trophozoits vary greatly in diameter upon —1 agar cultures ($9\ \mu$ — $30\ \mu$). They show an equal variation during the stage of active multiplication in ovomucoid cultures. The presence of certain salts seems to influence the size which an average amoeba may attain, e. g. on the addition of a small quantity of Sodium citrate (0,001—0,002 gm. for 5 c. c. of medium) to ovomucoid, the amoebae grew to be about twice the size encountered in plain ovomucoid (Textfig. 1). This enlargement was shown by most of the individuals at the close of active multiplication. They reverted to the smaller size upon re-inoculation into a tube of the same medium but after 7 days growth regained their original size. These large forms were usually uninucleated and are not to be confused with the large multinucleated forms described below though this hypertrophy may

Nährboden von Eiweiß mit oder ohne Amöbe, welche sie als *Amoeba albuminis* bezeichneten. Diese Nährböden hat in neuerer Zeit RINA MONTI wieder aufgenommen, indem sie sich einer Lösung von Eiweiß in destilliertem Wasser (2:1) oder von Eiweiß (2 T.) in durch 1% ige Karbolsäure angesäuertem Wasser (1 T.) bei 14° C. bediente. Sie züchtete ebenfalls *Amoeba albuminis* und empfahl diesen Nährboden auch für andere Amöben, z. B. *Amoeba vulgaris*“.

precede the multinucleate condition. They showed no particular variation from the usual size encountered in ovomuroid on the addition of like quantities of CaCl_2 , Na_2CO_3 , KCl , NaCl , MgSO_4 , Na_2SO_4 and NaNO_2 , while growth in the presence of like quantities of KNO_3 , KH_2PO_4 and KHCO_3 , resulted in the production of extremely small amoebae (Textfig. 2). Increase or decrease in the size of the nucleus accompanied similar variations in the amount of cellular protoplasm.

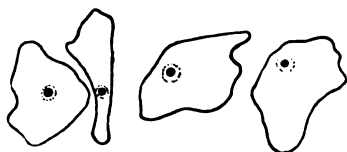


Fig. 1.



Fig. 2.

Text figures 1 and 2. — Camera lucida drawings from fixed and stained specimens. Same magnification.

The endoplasm is finely or coarsely granular. These granules ordinarily do not obscure the nucleus. When grown in ovomuroid containing a small amount of egg yolk the trophozoits become filled with large refractile granules such as one may see in amoebae in human faeces. Most of these large granules are of a fatty nature and stain orange with Scharlach R after fixation with formaldehyde. When the amoebae have been resident in such a medium for a comparatively short time and are then fixed with saturated bichloride of mercury and acetic, and stained by HEIDENHAIN'S iron-alum haematoxylin, the stained amoebae appear much vacuolated (Plate 9, fig. 5). But if such a culture is a month or so old, then many of the stained amoebae show the presence of large granules which stain a deep black (Plate 9, fig. 7).

A contractile vacuole may be found in most of the trophozoits under ordinary conditions of cultivation. After contraction it is usually reformed by the fusion of several minute isolated vacuoles. Its time interval of contraction varies between two and fifteen minutes and seems to be influenced by temperature, being more rapid in cultures grown at 35° – 37° C than in cultures grown at 18° – 24° C, and likewise more rapid in young than in old cultures. It is interesting to note, since the presence of a contractile vacuole is said to separate the free living from the parasitic amoebae, that under certain conditions the contractile vacuole may be absent or at least invisible. This was especially noted in a culture grown in ovomu-

coid, containing 0,001 gm Na_2SO_4 , for eleven days at 37°C . The observations were made at 34°C . Here several motile amoebae were watched for from 5—30 minutes without the detection of a contractile vacuole. The presence of a large number of fatty or other granules in the endoplasm obscures the contractile vacuole.

It may be of interest to describe here a reaction which I believe indicates the presence of peroxides in the living cell. When these amoebae are grown in ovomucoid containing a trace of sodium carbonate and then mounted in an aqueous solution of GRÜBLER'S methyl green, the granules within their cytoplasm exhibit a purple color in a few minutes. The nucleus does not give this reaction. Now methyl green is split by peroxides into a purple compound and this reaction occurs in the test tube only, in my experience, in the presence of traces of sodium carbonate.

If this reaction really indicates the presence of peroxides, it shows that the so-called "nutritional granules", or "plastids" in reality perform an important part in oxidations of the cell, and would seem to add significance to the observation of KITE and CHAMBERS, who found that the nucleus of the spermatogonia of the squash bug was composed of powerful reducing substances.

The ectoplasm is usually only visible when the trophozoits are in motion, that is, in cultures grown on —1 agar or in ovomucoid. This is true whether they are examined e. g. in the condensation water of —1 agar slants or in ovomucoid or diluted out in distilled water. Progression may be by means of a single large pseudopod such as has been described as characteristic of the amoebae of the *Limax* group or at times numerous finger-like pseudopodia may be simultaneously or alternately projected from any or every side. Delicate, radiating, filamentous pseudopodia were noted in cultures grown on 2 per cent agar with leucin and tyrosin. When moving on a surface, e. g. the under side of a cover glass, the trophozoits secrete a mucilaginous substance which trails out posteriorly in the form of delicate rays. That the ectoplasm is sticky is shown when attempts are made to pick up the trophozoits with a Barber pipette. This was also noted by SELLARDS (1911). The cysts and flagellated forms do not show this stickiness.

That the relative amount of endoplasm and ectoplasm may be determined by chemical or physical conditions, I believe is demonstrated by the following experiment:

A culture grown for 10 days at 22° — 24° in 5 c. c. ovomucoid containing 0,001 gm KNO_2 was used.

a) One loop of the culture was diluted with two loops of distilled water, and examined under a coverslip at room temperature. The trophozoites were very actively motile and projected numerous finger-like pseudopodia. The vacuole was seen to contract much faster than in the original culture itself. The ecto and endoplasm were well differentiated only on motion.

b) One loop of the culture was diluted with two loops of 0,2 and 0,4 per cent $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$. The trophozoites showed immediate differentiation between ecto and endoplasm with the latter concentrated about the nucleus. These trophozoites were actively motile at first but in a minute or two became rounded and dancing granules appeared in the endoplasm. Even in this condition many of them progressed for some minutes by projecting a clear blunt pseudopod which appeared at one edge and ran about the periphery of the amoeba.

The physical consistency of the cytoplasm is undoubtedly determined by environment. Trophozoites grown at room temperature may be examined in distilled water at room temperature without any apparent harm or effect. However if such a preparation is placed at 37°C for a few minutes the amoebae swell up and burst. And yet the trophozoites can be grown at 37°C as well as at lower temperatures. Possibly sudden changes in temperature interfere with the oxidative reactions of the cytoplasm. The trophozoites immediately swell up, while the endoplasm shrinks, when they are placed in an atmosphere of CO_2 , or O_2 , or treated with 3 per cent H_2O_2 diluted 200 times with distilled water (neutral to litmus). They swell up and burst if placed in distilled water containing a trace of chloroform (about 1:10,000).

The reaction of the cytoplasm is influenced by that of the media. At least the affinity for aqueous solutions of basic dyes is greatly enhanced when the amoebae are grown on —1 agar. This is notable in the vital staining of trophozoites and cysts.

The Nucleus.

The unstained nucleus is always plainly visible. It is distinctly of the limax type with a large karyosome surrounded by a thick nuclear membrane (Plate 8 and 9). In preparations which have been dried, fixed with methyl alcohol and stained for 18—24 hours with GIEMSA, the nuclear membrane is stained red and appears granular while the karyosome is either unstained or appears a faint

blue. After mercuric chloride and acetic acid GIEMSA's stain gives different results; the nuclear membrane is stained a deep homogeneous red or appears reticulated on sufficient differentiation with acetone and xylol, while the karyosome is stained a deep reddish black.

Nuclear division takes place both by amitosis and by promitosis. I have seen the nucleus divide by amitosis in ovomuroid preparations sealed under a coverslip. It was often difficult to find stages representing nuclear division in preparations made directly from cultures. This difficulty was overcome when it was discovered that exposure of a thin layer to a free oxygen supply, in a moist chamber, for 15—30 minutes, induced nuclear division. However, it should be noted that evidently the nuclei must have developed to the right degree of ripeness since even under the above conditions all the nuclei in all the amoebae do not start to divide.

Multinucleated forms: In the scum of growth formed on the surface of yolk-ovomuroid cultures many large multinucleated forms were found. Some of these were over 50 μ in diameter and contained from 2 to 30 or 40 nuclei. Plate 8 figs. 2, 3; Plate 9 figs. 1, 2, 3, 6, 9). When examined under a coverglass the cytoplasm of these forms was in a single well defined mass and remained so during progression (Plate 9 fig. 9). But when they were placed in a thin layer on a Barber moist chamber, the cytoplasm in many instances split up to form several trophozoites (Plate 8 fig. 2; Plate 9 figs. 1, 3).

Simultaneous, multiple mitoses were found in some of these preparations which had been exposed to free oxygen for 15 or 20 minutes (Plate 8 fig. 4). The stages of mitosis represented varied in different amoebae but the same stage was reached simultaneously by all the nuclei in any single amoeba (Plate 8 fig. 4; Plate 9 fig. 6).

Endogenous bud formation may be seen in fig. 2, Plate 8 and figs. 1, 2, 3, 4, Plate 9. No observations of value concerning their origin and fate were made. They occurred most frequently in yolk-ovomuroid cultures and were not found at all in —1 agar cultures.

II. The Cysts.

The cysts varied greatly in size even in the same culture tube (9,2 μ —39,6 μ). They were always uninucleated and showed less

variation in size on —1 agar cultures. However, in yolk-ovomuroid cultures the nuclei varied from one to eight. On the whole the structure of the cysts was best made out by vital staining in an aqueous mixture of Dahlia and Methyl blau. The general characters of the cysts and their markings is shown in Plate 9 figs. 10 and 11 and in Textfig. 8.

It may be of interest to note that many of the ripe cysts are "acid proof" when stained by the tubercle method. This may indicate a high fatty-acid content and so account for their greater resistance.

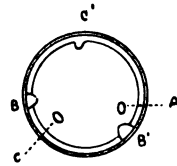


Fig. 8.

Text figure 8. On focussing down the cyst markings appeared in the alphabetical order indicated.

III. The Flagellates.

The flagellated forms were first noted in an ovomuroid culture grown for three days at 37° C. This culture was derived from a —1 agar subculture of the original stock and had been subcultured twice in ovomuroid in the previous three weeks. During the 5 months following this discovery, when special experiments were carried on to determine whether the chemical factors leading to the production of the flagellates could be discovered, a marked variation in the constancy of their appearance was noted. Many subcultures, from a culture showing flagellates, showed none on repeated and daily examinations covering periods of from 5—10 days.

It was found, however, that the addition of a loopful of the yolk of hen's egg to 5 c. c. of the ovomuroid, before sterilization, favored their development. Later on it was found that the most favorable conditions are furnished when the amoebae are placed in a very much diluted medium and supplied with as much atmospheric oxygen as possible. For example, when a loopful from the surface of a yolk-ovomuroid culture is mixed with two or three loopfuls of distilled water on a large coverslip and placed on a Barber moist chamber at 22°—25° C, no flagellated forms may be seen though innumerable trophozoites are present. No flagellates may appear for an hour or so but after three or four hours literally hundreds or thousands of flagellates may be seen.

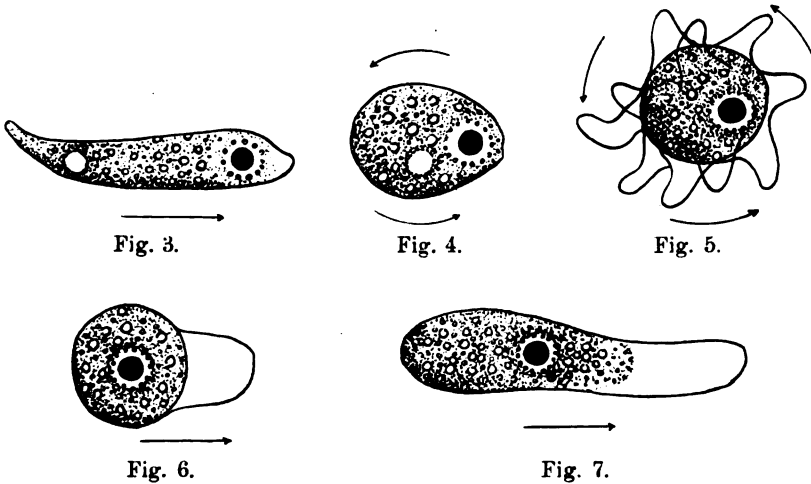
It is evidently of importance to determine whether an amoeba is capable of flagellating or not as has already been pointed out by NÄGLER, CHATTON, WHITMORE and others and while this method is only a modification of that employed by WASIELEWSKY and HIRSCH-

FELDER, and by WHITMORE, it seems to me to give better results. Further I have noted that actual growth and multiplication in the presence of egg yolk and an abundant supply of free oxygen favors subsequent flagellation. This is very well illustrated by the following: A transplant, from the original — 1 agar culture which had never been grown upon any other medium, was subcultured every fifth or sixth day in plain ovomuroid, at 22°—24° C for over a month, without the appearance of flagellates. It was then subcultured in ovomuroid containing yolk for three weeks. No flagellates were found in these cultures nor did they develop when diluted out in a Barber moist chamber — the examinations being made at short intervals throughout a day. The preparation was kept at room temperature and the trophozoits increased greatly in numbers and on the third day numerous flagellates appeared. The optimum oxygen tension requirements for the motility of these flagellates reminds one of analogous instances among the bacteria.

Characters of "Pure Lines" starting with Single Flagellates: I am indebted to Dr. G. L. KITE for two "pure lines", each originating from a single flagellated form. Two flagellates were picked up with the Barber isolation pipette (under the LEITZ obj 7 Oc. 6) and discharged into a very small drop where they could be plainly seen to be unaccompanied by trophozoits. Each one was then picked up separately and discharged into a minute drop of sterile ovomuroid. These single flagellates were kept under observation and in less than half an hour had turned over into the trophozoit form — there being only one trophozoit in each drop. More sterile ovomuroid was then added to each of these droplets. When the amoebae in these drops became numerous (they were innumerable 5 days later) they were subcultured. When compared with the original culture from which they were taken for the ability to flagellate it was soon seen that they not only flagellated more quickly but more constantly under the same conditions of growth. It is my intention to make a further comparative study of these pure lines.

The flagellated forms may be followed under the high power in an ordinary slide preparation provided the coverslip is raised to a sufficient distance by means of a thick ring of vaseline. If the coverglass is dropped on in the ordinary way the flagellates disappear at once. They vary as much as the trophozoits in size and morphology. Usually they are boat-shaped with the blunter end anteriorly. The nucleus can be plainly seen near the anterior end;

often there is a distinct vacuole near the posterior end. With vital staining, contraction of this vacuole has been seen to take place during the flagellated stage. Other flagellates may be pyriform with the pointed end progressing anteriorly. Again others, while progressing, will continuously throw out and withdraw numerous blunt pseudopodia from the surface. They progress rapidly with a gliding and not jerky motion and continuously rotate on the long axis. While following a flagellate one may see it assume all these forms or it may retain one form until it turns back into the amoeboid form. In a preparation sealed with vaseline, the flagellates usually turn over into the amoeboid state in 15 or 20 minutes, but in a preparation on the Barber moist chamber, i. e., in the presence of much free oxygen, one may follow a flagellate for an hour or more before it turns over.



The following illustrates very well what transpires while one follows a flagellate with the intention of witnessing its remarkable change of personality: For a while a flagellate (Textfig. 3) maintained the elongated form; then became pyriform (fig. 4) and whirled round an round; in a minute or so during its gyrations it projected numerous waves of blunt pseudopodia (fig. 5); shortly it suddenly became elongated again (fig. 3); it progressed in this form until twenty minutes after the observation commenced when it suddenly became motionless and spherical; in a few moments it projected a clear blunt pseudopod (fig. 6), into which the endoplasm flowed and then it wandered off as a typical trophozoite of the limax type (fig. 7).

In fixed and stained preparations, these forms are seen to be provided with two flagella (Plate 8 fig. 5). I have never seen three flagella as in the form described by WHITMORE as *Trimastigamoeba*. Once an unusually large flagellate was followed until it turned amoeboid when it was seen to be binucleated and provided with two pairs of flagella. The flagella arise from the anterior or nucleated end and are about twice as long as the body (Plate 9 fig. 8). They appear extremely thin when fixed with bichloride and stained with magenta but in reality are over a micron in diameter. They can barely be seen in the fresh condition with proper lighting but are more plainly visible when dilute neutral red is used for vital staining. I have not demonstrated the rhizoplast described by ALEXIEFF, WHITMORE and others. Nor have I any data concerning the significance of the flagellated stage; though on several occasions it was noted that the sites occupied by swarms of flagellates would be filled by encysted forms. The particular fate of these cysts has not been followed yet.

In conclusion I wish to express my thanks to Prof. GARY N. CALKINS for his interest and for the loan of literature otherwise inaccessible to me, and to Dr. CHAS GOOSMANN of Cincinnati, who took the accompanying photomicrographs.

Summary and Conclusions.

Almost daily observations during a year were made on an amoeba, genus *Vahlkampfia*, grown under varied environmental conditions. The results show:

1. That the characters of the genus must be extended to include the formation of multinucleated trophozoites and cysts, and multiplication by endogenous budding.
2. That the formation of the flagellates is best brought about by growth in yolk ovomucoid followed by transfer to distilled water under conditions of increased oxygen tension; that a "pure line" originating from a single flagellate shows an increased tendency towards flagellation.
3. That exposure to free oxygen induces nuclear promitosis, whereas amitosis is probably favored by a reduced oxygen tension.
4. There is some suggestive evidence that the cytoplasmic granules play an important part in the oxidations of the cell.

References cited in Text.

- ALEXEIEFF, A.: Sur les Caractères Cytologiques et la Systématique des Amibes du Groupe Limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des Amibes parasites des Vertèbres (*Proctamoeba* nov. gen.). Bull. de la Soc. Zoologique de France April 5 1912 XXXVII p. 55.
- BEIJERINCK, M. W.: Kulturversuche mit Amöben auf festem Substrate. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Abt. I 1896 Bd. 19 p. 257—267.
- CHATTON, ED.: Sur Quelques Eures D'amibes Libres et Parasites Synonymies, Homonymie, Improprété. Bull. de la Soc. Zoologique de France. April 25 1912 XXXVII p. 109—114. (With very full Bibliography.)
- CHATTON, ED. et LALUNG-BONNAIRE: Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) das l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. Bull. de la Soc. de Pathologie Exotique 1912, V p. 135—143.
- CRAIG, C. F.: Observations upon the Morphology of Parasitic and Cultural Amebae. Journ. Med. Research 1912 XXVI p. 1—33.
- GAUDUCHEAU, A.: Cils géants et corps fuso — Spirillaires amibiens. Comp. Rend. Soc. Biol. 1911, LXX, p. 172. Figures in Bull. de la Soc. Path. Exotique 1909, II, p. 568.
- GLÄSER, HANS: Untersuchungen über die Teilung einiger Amöben, zugleich ein Beitrag zur Phylogenie des Centrosoms. Arch. f. Protistenk. 1912 XXV p. 27—144.
- GOOSMANN, CHAS.: A Method of Demonstrating Spirochaetae and Trypanosomes by Means of Nigrosin. Jour. of Cutaneous Diseases, including Syphilis Dec. 1911.
- KITE, G. L. and CHAMBERS, ROBERT JR.: Vital staining of Chromosomes and the Function and Structure of the Nucleus. Science (1912) N. S. Vol. XXXVI No. 932 p. 639—641.
- SALOMON, H.: Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Abt. I 1896 Bd. 19 p. 433.
- SELLARDS, A. W.: Immunity Reactions with Amoebae. Philippine Journ. of Science 1911 VI, 281 (Series B).
- SÖHNGEN, N. L.: Methan as carbon food and Source of Energy for Bacteria. Proceedings Roy. Acad. Amsterdam 1905 VIII p. 327—331.
- WHITMORE, E. R.: Studien über Kulturamöben aus Manila. Arch. f. Protistenk. 1911 XXIII p. 81—95.
- WHITTAKER, H. A.: The Source, Manufacture and Composition of Commercial agar agar. Journ. Amer. Pub. Health Assoc. 1911 Vol. 1 p. 632—639.
- WILLIAMS, ANNA W.: Pure Cultures of Amebae Parasitic in Mammals. Journ. Med. Res. Dec. 1911 Vol. 25 p. 263—283.

Decription of Plates.

Plate 8.

(Photomicrographs.)

Forms of the associated Spirillum. GOOSMANN'S aniline-black method. $\times 1000$.

a, β , γ .

Fig. 1. Smear from the surface of a yolk-ovomucoid culture to show the luxuriant growth to be obtained on this medium. $\times 240$.

Fig. 2. Multinucleated form, containing two endogenous buds, splitting up when placed in contact with free oxygen for 15 minutes before fixation. $\times 500$.

Fig. 3. Multinucleated form from same preparation as fig. 2. About thirty nuclei present with fifteen showing in focus. $\times 500$.

Fig. 4. Multinucleated form from same preparation as fig. 2. All four nuclei in same stage of promitosis. $\times 1000$.

Fig. 5. Binucleated, dividing, with large endogenous bud. $\times 1000$.

Fig. 6 u. 7. The flagellated stage. $\times 1000$.

Plate 9.

Fig. 1. Enlarged view of the amoeba shown in Plate 8 fig. 2. Chromatin in endogenous buds represented by aggregations of granules. (Spencer Apochromatic 1/12, Comp. Oc. 6).

Fig. 2. Single large endogenous bud in binucleated amoeba. Nucleus of bud better developed. The trophozoite is $28,8 \mu \times 10,8 \mu$. The bud is $5,4 \mu$ in diameter. (Same magnification.)

Fig. 3. Showing a very young endogenous bud in one lobe. (Same magnification.)

Fig. 4. Showing two fairly well developed endogenous buds, each about $3,6 \mu$ in diameter. Nuclei of buds indefinite. (Same magnification.)

Fig. 5. Showing the great vacuolization of endoplasm when the fat is washed out of the amoebae in young yolk-ovomucoid cultures. (Grown for six days at 24° C.) (Same magnification.)

Fig. 6. Showing multiple mitosis and cytoplasmic division on exposure to free oxygen. (Same magnification.)

Fig. 7. Trophozoite from yolk-ovomucoid filled with deeply staining granules which resist decolorization in Heidenhain's method. (Same magnification.)

Fig. 8. Flagellated form showing position of nucleus and vacuole. Heidenhain-magenta. (Same magnification.)

Fig. 9. Multinucleated form $57,6 \mu \times 27 \mu$. (Same magnification.)

Fig. 10. Binucleated cyst $12,6 \mu$ in diameter with dead cyst full of the symbiotic bacillus near by. (Same magnification.)

Fig. 11. Cyst with eight nuclei. From an unstained preparation. Diameter of cyst $39,6 \mu$.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

(Aus dem Institut für Fischpathologie an der Wiener tierärztlichen Hochschule.)

Studien über die Schwimmblasencoccidien der Gadusarten (*Eimeria gadi* n. sp.).

Von
J. Fiebiger.

(Hierzu Tafel 10 und 9 Textfiguren.)

Einleitung.

Unsere Kenntnisse über die Coccidien gründen sich im wesentlichen auf drei Arten, nämlich *Eimeria schubergi*, *E. stiedae* und *Cyclospora caryolytica*. Diese Species sind so gründlich durchforscht und zeigen in bezug auf ihre Biologie, zum Teil auch auf Morphologie so viele Übereinstimmungen, daß wir ihre Eigenschaften als die der Coccidien überhaupt betrachten und von vornherein bei erheblichen Abweichungen eher geneigt sind, Beobachtungsfehler anzunehmen.

Man darf jedoch nicht vergessen, daß die Lebensformel sich ändern muß, wenn neue Größen in sie eintreten.

Nun sind die erwähnten drei Species Schmarotzer der Landtiere. Die Coccidien stehen daher während des wichtigen Teiles ihrer Entwicklung, der sich außerhalb des Wirtstieres abspielt, nämlich während der Sporenentwicklung, unter dem direkten Einfluß der Atmosphäre. Bei den Wassertieren geraten dagegen die Coccidien nach dem Verlassen des Wirtstieres in Süß- oder Salzwasser. Nachdem man dem Sauerstoff der Luft gerade für dieses Stadium

einen gewissen Einfluß zubilligt, müßte man schon deshalb solche Verschiedenheiten als schwerwiegende betrachten, abgesehen von dem physikalischen Einfluß, den das Wasser ausübt.

Die vorliegende Art, mit welcher ich mich mit Unterbrechungen schon seit Jahren befasse, zeigt nun in der Tat einige wesentliche Abweichungen von diesen Paradigmen, besonders in biologischer Hinsicht.

Die eingangs zitierten Species konnten deshalb so eingehend studiert werden, weil sie der experimentellen Forschung verhältnismäßig leicht zugänglich sind. Für unsere in Tiefseefischen schmarotzende Art ist dies kaum möglich, besonders einem Bewohner des Binnenlandes. Außerdem ist die Beschaffung vollständig frischen und gut konservierten Materiales sehr erschwert, die Beobachtung des lebenden Parasiten ganz ausgeschlossen.

Die Untersuchung konnte daher keine lückenlosen Resultate zeitigen, sie mußte wieder zu Analogieschlüssen und Hypothesen greifen. Obwohl ich aus diesen Gründen die Erforschung meiner Species nicht als vollendet betrachten kann, habe ich mich doch entschlossen, meine bisherigen Untersuchungsergebnisse zu publizieren, da ich immerhin einige bemerkenswerte Beobachtungen machen konnte und keine Hoffnung habe, in absehbarer Zeit neue Methoden anzuwenden und besseres Material erhalten zu können.

Im Jahre 1906 unternahm ich mit einem Fischdampfer der Dampffischereigesellschaft „Nordsee“ eine Reise in die isländischen Gewässer und hatte beim Ausweiden der reichlich gefangenen Fische Gelegenheit, vorzugsweise von den Gadusarten eine Anzahl parasitologisch und pathologisch interessanter Objekte zu sammeln. Unter anderen beobachtete ich gar nicht selten in der Schwimmblase eine gelbe, crèmeartige Masse, welche mich an eingedickten Eiter erinnerte. Erst bei meiner Rückkehr belehrte mich die mikroskopische Untersuchung, daß die Masse zum größten Teile aus Coccidiensporen bestehe.

Bei Durchsicht der Literatur fand ich nur in einer Abhandlung von JOH. MÜLLER aus dem Jahre 1842 eine Beschreibung dieses Vorkommnisses in der Schwimmblase von *Gadus callarias*, welche ich zum Teil wörtlich zitieren will.

JOH. MÜLLER beschreibt die Inhaltsmasse der Schwimmblase als „gelbe Materie“, welche oft die geräumige Blase vollständig ausfüllt und der geschwellenen Innenschichte anhaftet. Die Materie besteht zum größten Teil aus Kapseln, welche zu drei und vier beisammenliegen und sich aus zwei Hälften (Naviculæ) zusammensetzen,

die zum Teil sich schon nach Art einer Schote getrennt haben. Zwischen diesen Hälften ist ein mit Blasen versehenes Klümpchen wahrnehmbar, das auch noch zum Teil die Höhlung der Schälchen ausfüllt. „Die Körperchen (die Sporenkapseln) werden frei, bilden ihren Inhalt aus und teilen sich der Länge nach; sie bleiben noch eine Zeitlang durch den Inhalt in der Mitte verbunden, bis sie sich ganz lösen und der Inhalt frei und vielleicht der Grund zu einer neuen Entwicklung wird.“ Die befallenen Fische erweisen sich auch sonst als krank, da der Schwanzteil abgemagert ist. Den Fischern war der Zusammenhang zwischen dieser Schwimmblasenerkrankung und der angeführten Veränderung des Habitus wohl bekannt und sie bezeichneten solche Exemplare als ungenießbar.

JOH. MÜLLER reiht diese Gebilde unter die „Psorospermien“ ein, welchen Namen er einige Jahre zuvor für in kleinen Schläuchen und Knötchen in Haut, Kiemen, Muskeln und Harnblase bei Fischen und Fröschen vorkommende Protozoen gebraucht hatte. Da die letztgenannten Gebilde zweifellos Myxosporidienknötchen sind, scheint sich die Meinung herausgebildet zu haben, daß auch die Schwimmblasenschmarotzer Myxosporidien gewesen seien. Dies scheint mir aus dem von BÜTSCHLI in BRONN'S Klassen und Ordnungen gegebenen historischen Überblick hervorzugehen.

Gegenwärtig genügt ein Blick auf die von J. MÜLLER dem Aufsätze angefügte Tafel, um zu erkennen, daß wir hier typische Coccidientetrasporen vor uns haben. Es muß immerhin auffallen, daß die in so massiger Weise und relativ häufig bei einem unschwer zu beschaffenden Objekte schmarotzenden Coccidien durch 60 Jahre der Untersuchung entgehen konnten, obwohl die Coccidien in den letzten 15 Jahren ein so beliebtes Untersuchungsobjekt geworden sind.

Daß man sich auch damals schon eifrig mit „Krebsparasiten“ beschäftigte, beweisen die darauffolgenden Erörterungen, in welchen sich jedoch JOH. MÜLLER gegen eine Beziehung dieser Parasiten zur Geschwulstbildung aussprach.

Wie man sieht, hat diese Coccidienart auch ein historisches Interesse, da sie eine der ersten beobachteten Coccidien überhaupt ist. (Nur *E. stiedae* wurde früher entdeckt.) Bei der Unvollkommenheit dieser Beschreibung, welche dem damaligen Stande der Sporozoenforschung entspricht, war ich wohl berechtigt, diese Coccidienart als neu entdeckte Form¹⁾ zu betrachten. Nach den charakteristi-

¹⁾ Erst nach dem Erscheinen meiner ersten, vorläufigen Mitteilung kam mir ein Aufsatz von ACERBACH zur Hand, worin dieser Autor ebenfalls diese Coccidien

schen Merkmalen (Öffnung der Sporen mittels Längsnaht, kein Restkörper in den Sporen) reihte ich sie, der Einteilung LABBÉ's folgend, in einer vorläufigen Mitteilung unter die Gattung *Goussia* ein und gab ihr den unverbindlichen Namen *Goussia gadi*, welchen Namen ich, der geänderten Nomenklatur folgend, in meinem Lehrbuche der Parasitologie in *Eimeria gadi* umänderte.

Nach dem LÉGER'schen System, welches auch DOFLEIN übernommen hat, ist die Species in die Gattung *Eimeria* der Gruppe *Octozoica*, welche wieder zu der Familie der *Eimeridae* gehört, zu stellen. Es ist freilich von vornherein zu bemerken, daß die beiden sonst hier als Merkmal vorkommenden zwei Geißeln der Microgameten bei unserer Species fehlen. Des weiteren möchte ich diese Art am ehesten unter die Untergattung *Goussia* LABBÉ einreihen, obwohl die Sporen sich zum Teil schon in der Schwimmblase öffnen.

Material und Untersuchungsmethoden.

Meine vorläufige Mitteilung gründete sich auf die Untersuchung von Objekten, welche ich nebst anderen interessanten Funden in einer Blechkanne mit ca. 5 % Formollösung an Bord des Schiffes sammelte. Da Formol Kernverhältnisse nur mangelhaft fixiert, konnten cytologische Details und Entwicklungsformen nur in groben Umrissen skizziert werden. Neues und ziemlich frisches Material verschaffte ich mir während eines Aufenthaltes am Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg direkt auf dem Fischmarkt. Die Fische hatten jedoch auch schon 4—5 Tage Lagerungszeit in Eis hinter sich. Von diesem Material wurden feuchte, in Sublimat fixierte und trockene Ausstriche angefertigt, letztere zur Färbung nach GIEMSA: in FLEMMING'scher Flüssigkeit und in Sublimatalkohol fixierte Objekte dienten zur späteren Anfertigung von Schnittpräparaten, wobei mich mein Freund MOROFF unterstützte. Leider kam die geplante gemeinsame Bearbeitung nicht über die Vorarbeiten hinaus.

Weiteres Material wurde mir in liebenswürdiger Weise von Herrn Fischereidirektor LÜBBERT aus Hamburg geschickt. Aber

der Schwimmblase bei *Gadus virens* erwähnt und sie gleichfalls als eine *Goussia*-Art bestimmt.

auch in unseren Seefischhallen sind nicht selten infizierte Schwimmblasen erhältlich. Da die Schwimmblase retroperitoneal liegt und bei den Gadiden mit den Rippen verwachsen ist, bleibt sie beim Ausweiden im Fischkörper. Wenn letzterer nun beim Verkauf durch Zerschneiden der Quere nach in metamere Stücke zerlegt wird, quillt die gelbliche Inhaltsmasse aus der klaffenden Öffnung der Schwimmblase heraus. In den Binnenstädten muß freilich damit gerechnet werden, daß die Fische, welche aus den isländischen Gewässern stammen, doch schon eine ca. zweiwöchentliche Lagerungszeit in Eis hinter sich haben.

Von allen diesen Objekten wurden Ausstriche und Schnittpräparate angefertigt, aber auch Beobachtungen am Nativpräparate gemacht. Als Fixationsflüssigkeit wurde fast ausschließlich Sublimatalkohol-Eisessig angewendet. Das FLEMMING'sche Gemisch war deshalb weniger geeignet, weil bei der nachfolgenden Färbung nach HEIDENHAIN die Chromatinelemente zu wenig gegenüber den ebenfalls geschwärzten Fetteinlagerungen abstechen.

Als Kernfärbemittel dienten Hämalaun, Hämatoxylin DELAFIELD, Eisenhämatoxylin, BÖHMER's Hämatoxylin, Safranin, Bóraxkarmin, Methylgrün, letzteres nicht mit befriedigendem Resultat.

Auch die für Schnitte und Feuchtpräparate modifizierte Färbung nach GIEMSA wurde angewendet, jedoch ohne nennenswerten Vorteil.

Das Vorkommen von so großen Massen von Protozoenleibern in einer geschlossenen, ursprünglich mit Gas gefüllten Höhle ließ dieses Objekt auch als sehr geeignet zur chemischen Untersuchung erscheinen. Eine solche ist für den Protozoenkörper bis jetzt nur unvollkommen gelungen. Bei der mikroskopischen Kleinheit des Einzelindividuums ist man zumeist auf die mangelhaften mikrochemischen Reaktionen angewiesen. Es bedarf einer ganz ungeheueren Individuenzahl, bis das für eine Analyse nötige Quantum erreicht ist. Bei den parasitischen Protozoen ist überdies eine Trennung von störenden Beimengungen (dem Ernährungsmedium, dem Wirtsgewebe) kaum durchzuführen. Nur in unserem Falle vermehren sich die Protozoen in einen leeren Behälter hinein in ganz ungeheurem Maße, die Schwimmblase ist gewissermaßen ein Depot für Protozoenleiber. Herr Professor PANZER hat nun die Masse einer eingehenden chemischen Untersuchung unterzogen und in der Tat bemerkenswerte Resultate erzielt. Auf Grund derselben wurden dann von mir mikrochemische Bestimmungen von Ausstrichen mit Osmiumsäure, Scharlach und Sudan, sowie Untersuchungen unter Anwendung des Polarisationsmikroskopes vorgenommen.

Vorkommen und makroskopische Beschaffenheit.

Wie erwähnt, kommen diese Coccidien in der Schwimmblase von Gadiden nicht selten vor. Ich fand sie beim Köhler (*Gadus virens*), auch Seelachs genannt, beim Kabljau oder Dorsch (*Gadus morrhua* oder *callarias*) und beim Schellfisch (*Gadus aeglefinus*). Am häufigsten fand ich sie beim *Gadus virens*, der die Hauptmenge des Ergebnisses der Schleppnetzfischerei ausmacht. Auf dem Hamburger Fischmarkte, wo mir systematische Untersuchungen möglich waren, fand ich sie im Monat September in 5 Proz. der Fälle. Nach Angaben der Marktpersonen sind periodische Schwankungen entsprechend der Jahreszeit vorhanden, was nur mit einer sehr raschen Vermehrung der Sporozoen in Einklang zu bringen wäre. Bezüglich der Provenienz konnten als sichere Fundorte festgestellt werden: Der wichtigste Fangplatz am südöstlichen Rande von Island, der sog. Ingolfs Hoefde, ferner die Gegend der Faröerinseln, genauer 60° nördlicher Breite und 2° östlicher Länge (3 Köhler und 4 Schellfische), ferner die Nordsee mit unbestimmter Lokalisation.

Der Umstand, daß ich bei längerem Suchen stets unter verschiedenen Fängen infizierte Exemplare antraf, läßt den Schluß zu, daß die Verbreitung unter diesen drei Gadiden eine allgemeine ist. Ob auch andere Gadusarten, z. B. der *Gadus merlangus* des mittelländischen Meeres, davon befallen sind, wie J. MÜLLER vermutet, konnte ich nicht feststellen.

Bevor wir auf die Besprechung der Inhaltsmasse übergehen, wollen wir kurz die anatomischen und histologischen Verhältnisse der Schwimmblase bei den Gadusarten skizzieren.

Die Schwimmblase ist bei den Gadiden ein einfacher, häutiger, mit Gas gefüllter und allseitig geschlossener, schlauchförmiger Sack am First der Bauchhöhle. Ein Luftgang existiert nicht, die Gadiden sind also den Physoklisten zuzuzählen. Gegen die Bauchhöhle ist der Sack durch das hier schwarzgesprenkelte Peritoneum geschieden, von der Wirbelsäule ist er durch die schwarze, streifenförmige Niere getrennt.

Vorne ist die Schwimmblase geräumiger, nach hinten zu verschmälert sie sich allmählich. Das Vorderende reicht bis in die Herzregion. Sie schickt von diesem Ende kopfwärts zwei seitliche, blind geschlossene, etwas gewundene Hörner in die Weichteile zu beiden Seiten der Wirbelsäule. Diese Hörner wurden von CUVIER fälschlich für Luftgänge gehalten.

Nach rückwärts zu erstreckt sich die Schwimmblase durch den ganzen Bauchraum und noch weiter zwischen die Muskulatur und zwischen die Hämalfortsätze der Wirbelkörper, so daß das verschmächtigte Ende erst nach Auseinanderdrängung der Muskulatur und Durchtrennung dieser Knochenspangen sichtbar wird.

An der Schwimmblasenwand unterscheiden wir makroskopisch zwei Schichten, eine dicke straffe und schwer schneidbare äußere Haut, die *Fibrosa*, und eine dünne, opalisierende innere Haut, die *Mucosa*. Erstere ist durch dicke Einstrahlungen mit den Rippen verbunden.

Die Schwimmblase kann erst ausgelöst werden, wenn wir alle diese Pfeiler durchtrennt haben. Die Innenhaut ist nur locker mit der *Fibrosa* verbunden und läßt sich unschwer von ihr ablösen.

Mikroskopisch besteht die *Fibrosa* aus dicht gedrängten, parallel angeordneten Bindegewebsbündeln, in welche sehr lange und dünne Kerne eingelagert sind. Essigsäurezusatz löst diese Fasern auf und läßt ein Netzwerk von elastischen Fasern erkennen, das auch sehr schön durch Orcein darstellbar ist. Die *Mucosa* besteht aus einem Netzwerk von Bindegewebsfasern, welche jedoch in eigentümlicher Weise modifiziert sind. Sie erscheinen nämlich im Zupfpräparat als sehr lange, spindel- oder nadelförmige, verzweigte und starre Fasern. Eingelagert sind zahlreiche rundliche Kerne. Zwischen ihnen liegt eine amorphe Substanz. Außerdem sind noch platte, derbe, länglich viereckige, elastische Blättchen vorhanden, welche bis auf den in der Mitte gelegenen ovalen Kern strukturlos sind. Nach innen von der derben Faserhaut ist eine Lage von glatten Muskelfasern vorhanden.

Im Vorderteil der Schwimmblase liegt an der ventralen Innenseite ein flächenhaft ausgebreitetes, rasenartiges Gebilde, der rote Körper. Er besteht aus einem Wundernetz von parallel angeordneten Gefäßen. An seiner Oberfläche trägt er ein kubisches Epithel, welches drüsenartig zwischen die Gefäßschlingen in Form von Schläuchen in die Tiefe ragt. Von diesen Schläuchen, welche ein deutliches Lumen besitzen, soll ein schleimiges Sekret sezerniert werden, das kein Mucin ist und ein Nucleoproteid enthält. Die Innenfläche der Schwimmblase ist von einem Plattenepithel ausgekleidet, das sich im Bereich des roten Körpers in das kubische Epithel desselben fortsetzt.

Außer dem roten Körper ist noch ein Gefäßnetz zwischen den beiden Häuten vorhanden.

Bei Fischen mit geschlossener Schwimmblase, zu welchen auch die Gadiden gehören, soll das enthaltene Gas zu 69—87 Proz. aus Sauerstoff bestehen, der Rest ist Stickstoff und Kohlensäure.

An infizierten Schwimmblasen zeichnet sich die Mucosa meist durch einen stärkeren rosaroten Farbenton, der jedenfalls auf eine entzündliche Gefäßinjektion zu beziehen ist, aus.

Die Masse repräsentiert, wenn sie die Schwimmblase vollständig ausfüllt, ein recht beträchtliches Quantum (100—170 g). Die Konsistenz ist gallertig, schleimig bis dickflüssig, am besten mit Creme zu vergleichen. An der Wand ist sie zäher. Die Farbe schwankt zwischen einem rein weißen und einem intensiv gelben Farbenton. Unmittelbar an die Schleimhaut schließt sich eine graulich durchscheinende Schicht, welche zum größten Teil aus Jugendformen, zum kleineren aus Sporen besteht. Nach innen davon ist die Masse undurchsichtig, entsprechend dem reichlichen Gehalt an Fettkügelchen. Der optische Unterschied ist in ähnlicher Weise begründet, wie der von Colostrum und Milch.

Auffallend sind in dem zentralen Teil braune, mehr bröcklige Massen, welche sich unter dem Mikroskope als aus Kristalldrüsen bestehend erweisen. Ich fand solche braune, bröcklige Massen besonders in der Gegend des roten Körpers.

Bei Fällen mit totaler Anschoppung sind auch die Hörner mit Sporen gefüllt. Der rote Körper ist an seiner Oberfläche von weißen Streifen durchzogen, welche ebenfalls aus Tetrasporen bestehen. Mitunter ist das Cavum nicht vollständig mit der Masse ausgefüllt, und die Parasiten bilden einen röhrenförmigen Belag an der Wand der Schwimmblase.

Eine besondere Besprechung erheischt ein Fall, den ich als Anfangsstadium betrachten kann. Hier ist bloß das Vorderende vollständig ausgefüllt. Die Hörner sind leer. Hinter dem roten Körper ist nur die Ventralwand der Schwimmblase von einer gelben, zähen Schicht bedeckt, welche sich nach rückwärts immer mehr verdünnt und schließlich vollständig aufhört.

Dieser Befund weist darauf hin, daß die Infektion vom Vorderende, wahrscheinlich vom roten Körper, ausgeht. Von hier aus hat sie sich an den abhängigen Partien allmählich nach rückwärts ausgebreitet. Die reichlich produzierten Sporen füllten demgemäß zuerst den vorderen Anteil der Schwimmblase aus.

Mikroskopische Beschaffenheit.

Betrachten wir ein Partikelchen der Masse im Quetschpräparate unter dem Mikroskope, so fallen uns als am meisten charakteristisch sofort die dickschaligen großen Sporen auf.

Häufig liegen sie in Vierergruppen (Tetrasporen) beisammen und werden von einer dünnen, durchsichtigen Hülle zusammen gehalten. Vielfach treffen wir sie aber auch frei im ganzen Gesichtsfelde zerstreut, dies besonders bei totaler Anschoppung in den zentral gelegenen Partien. Die Kapseln sind entweder geschlossen und lassen in ihrem Innern eine mit stark lichtbrechenden Bläschen versehene Inhaltsmasse erkennen oder sie sind geöffnet. Sie erweisen sich dann als bestehend aus vollständig gleichen Schalenhälften, welche durch eine Längsnaht nach Art einer Schote verbunden sind (J. MÜLLER's *Naviculae*). Von letzterer ist bei vollständig intakten Sporen nichts zu sehen.

Die Schalenhälften klaffen entweder bloß an einem Pole, während sie mit dem anderen noch zusammenhängen, oder sie sind quer zur Längsachse auseinandergeschoben und werden in der Mitte noch durch die protoplasmatische Inhaltsmasse verbunden, oder sie zeigen eine Längslinie als Zeichen der beginnenden Öffnung. Vielfach sieht man die Schalenhälften auch regellos zerstreut und dann leer.

Neben den Sporen treffen wir zahlreiche Oocysten mit kugeligen Sporoblasten oder erst in Furchung und Abschnürung begriffen. Während die entwickelten Sporen nur wenige, stark lichtbrechende Bläschen erkennen lassen, sind die jüngeren Stadien gleichmäßig grob granuliert.

Zwischen diesen Gebilden finden sich in wechselnder Menge Körnchen und Tröpfchen von verschiedenem Kaliber und Massen, die wir mit dem Namen Detritus belegen müssen. Die Tröpfchen und Tropfen sind stark lichtbrechend und erweisen sich durch ihr optisches Verhalten (Auftreten eines Lichtpunktes bei hoher Einstellung, Färbung mit Sudan, Scharlach und Osmiumsäure) als aus Fett bestehend. Das gleiche Verhalten zeigen auch viele Einschlüsse in den Formelementen. Ferner ist oft das ganze Gesichtsfeld von spitzen Nadeln überschwemmt, jedenfalls sog. Margarinnadeln. Solche finden sich auch vereinzelt vor. Das Vorkommen in größeren Massen in den bröckligen, graubraunen Einlagerungen in der Mitte des Blaseninhaltes wurde schon erwähnt. Ferner beobachten wir

vereinzelt und in größerer Menge charakteristische Cholesterintafeln.

Während manche Teile fast nur aus Sporen bestehen, überwiegt an anderen Orten die Zwischenmasse und die Sporen sind nur spärlich vorhanden.

Andere Entwicklungsformen finden wir besonders gehäuft in der transparenten Schicht, welche sich an die Mucosa anschließt. Es sind große, grobgranulierte Kugeln, welche von der Umgebung durch eine helle, ziemlich breite Zone abgegrenzt sind. In letztere sind häufig noch stark lichtbrechende Körner eingelagert. Eine solche helle Zone umgibt übrigens auch die Oocysten und mitunter auch die Tetrasporengruppen. Sie fehlt in den zentralen Partien. Über die Natur dieser Stadien läßt sich im Nativpräparate nichts aussagen. Darüber geben bloß die Schnittpräparate oder Ausstriche Auskunft.

Eine Eigenbewegung der Parasiten, welche sonst unter den Coccidien den Sporozoiten, Merozoiten und besonders den Microgameten eigen ist, war am frischen Präparat niemals zu sehen, obwohl auch bei niedriger Temperatur beobachtet wurde, um in dieser Hinsicht den Verhältnissen des Meeresgrundes nahe zu kommen. Es ist dies eine auffallende Erscheinung, weil die sonstige Lebensfähigkeit der Sporozoen, welche auch für die Übertragung auf einen neuen Wirt notwendig ist, ein so schnelles Aufhören der Lebensfunktionen bei der Konservierung in Eis nicht vermuten läßt. Wir müssen jedoch folgendes erwägen:

Die Fische werden mit dem Schleppnetze aus einer Tiefe von 80—100 m heraufgeholt. Sie stehen daher an ihrem Standorte unter einem Druck von 8—9 Atmosphären, welcher an der Wasseroberfläche gleich um 7—8 Atmosphären verringert wird. Die Folgen dieser Druckdifferenz äußern sich in einem Betäubungszustande, der die Fische veranlaßt, abgesehen von einigen reflektorischen Schlägen auffallend regungslos auf dem Verdecke des Schiffes zu liegen. Die im Blute absorbierten Gase treten aus. In den durchscheinenden Gefäßen der Baueingeweide ist das Blut in abgerissenen Säulen sichtbar. Dort wo lockeres Unterhautzellgewebe vorhanden ist, treten die Gase in dasselbe über und heben die Haut polsterartig ab, so z. B. an der Innenseite der Kiemendeckel. Bei manchen Fischen, wie den Goldbarschen, wird ein Teil der erweiterten Schwimmblase durch das Maul oder sogar seitlich durch die Kiemenpalten und weiter unter dem Kiemendeckel herausgetrieben, eine

Erscheinung, die wir übrigens auch bei den Grundfischen unserer Binnenseen nach dem Fange beobachten (Trommelsucht).

Es ist klar, daß diese plötzliche Herabsetzung des Druckes auch für die Lebensfunktionen des Protozoenprotoplasmas nicht gleichgültig ist.

Nach dem Ausweiden werden die Fische ferner sofort zwischen Eispulver gelagert und verharren darin bis zum Verkauf. Sie werden daselbst auf 0° abgekühlt, und es bilden sich Eisnadeln auch in der Protozoenkolonie, welche erst bei der Zimmertemperatur auftauen.

Auch dieses Moment ist geeignet, das Leben der Protozoen zu vernichten.

Es ist ferner zu bedenken, daß man bloß den Sporen eine sehr bedeutende Lebensfähigkeit zuschreibt, welche durch die schützende Kapsel bedingt ist. Gerade die Formen, welche eine starke Beweglichkeit zeigen (Microgameten, Sporozoiten, Merozoiten), dürften im freien Zustande eine nicht viel höhere Widerstandskraft besitzen, wie die Gewebszellen.

Das durch die Schwimmblasenwand hindurch diffundierende Eiswasser dürfte schließlich in ähnlicher Weise schädigend einwirken, wie anisotonische Lösungen auf die gerade bei Fischen sehr empfindlichen roten Blutkörperchen.

Für die so wichtige vitale Untersuchung war demnach das mir zur Verfügung stehende Material nicht geeignet. Es wären hierzu Untersuchungen auf dem Schiffe selbst oder ganz kurz nach dem Fang in einer nahe gelegenen Hafenstadt auszuführen.

Besser als dies Nativpräparate tun können, orientieren gefärbte Ausstriche und Schnittpräparate über das Verhältnis der Parasiten zur Schwimmblasenwand, sowie über die Entwicklungsstadien und ihre Struktur. Man ist bei der Betrachtung der gefärbten Objekte überrascht und entzückt von der Fülle der Bilder, die sich in einem einzigen Präparate, mitunter sogar in einem einzigen Gesichtsfelde darbieten. Wir finden hier Formen, welche allen Entwicklungsperioden der bekannten Coccidien entsprechen.

Erst bei näherem Studium der cytologischen Details ergeben sich so erhebliche Schwierigkeiten, daß ich eine Anzahl von Fragen noch offen lassen muß. Zum Teil liegt freilich die Ursache darin, daß das Untersuchungsmaterial, wie schon erwähnt, nicht ganz einwandfrei war.

In Schnitten, welche die Schwimmblasenwand durchqueren, ist, wie dies schon die Nativpräparate vermuten ließen eine Schich-

tung unverkennbar. Die Jugendstadien liegen nach außen zu gegen die Mucosa, die späteren Entwicklungsformen, vor allem die Sporen liegen weiter nach innen und werden in das Lumen der Schwimmblase abgestoßen. Dementsprechend ist bis zu einem gewissen Grade das Nebeneinander einem Nacheinander gleichzusetzen, so daß sich aus der Beschreibung des histologischen Bildes schon gewisse Aufschlüsse über den Ablauf des Entwicklungsprozesses ergeben.

Das Schnittpräparat (Taf. 10 Fig. 1) zeigt uns folgendes Bild:

Die Coccidien finden sich erst nach innen von der Gefäßschicht in den Maschen der Mucosa. Von außen nach innen gerechnet kommen wir zuerst auf eine Lage von verschiedenen jungen Entwicklungsstadien, vor allem solchen, welche der Schizogonie zuzurechnen sind: Vollständig ausgebildete Rosetten, ferner im Gewebe zerstreute Merozoiten, die einen noch in Keulenform, andere schon mehr rundlich oder oval. Mitunter füllen die Merozoiten noch in Nestern langgestreckte Lücken aus, andere wieder liegen vereinzelt. Zwischen den Merozoiten und den reifen Schizonten finden sich alle möglichen Übergangsformen: Schizonten mit bloß zwei Kernen, ferner solche mit einer Vielzahl von Kernen.

Die Kerne sind dann um ein imaginäres Zentrum zirkulär angeordnet. Bei anderen wieder hat sich das Protoplasma schon um die Kerne abgeschnürt.

Eine weitere Kategorie von Gebilden stellen die Microgametocyten und die Macrogameten dar. Erstere sind unzweifelhaft als solche zu erkennen, wenn sehr viele spindelförmige Kerne an der Peripherie angeordnet sind. Sehr auffallend sind ferner die oft recht zahlreichen länglichen, reifen Microgametocyten mit den haarförmigen Microgameten. Die Macrogameten zeichnen sich durch das einheitliche Caryosom, durch die Kernsaftzone, durch die chromatischen Körnchen im Plasma, sowie durch die Größe aus. Dies unterscheidet sie auch von den Schizonten, welche bei dieser Größe schon viele Kerne aufweisen würden.

Weiter nach innen treffen wir die Oocysten: Solche mit chromatinarmem und scheinbar kernlosem Protoplasma, jedoch noch einheitlich, ferner solche mit beginnender Furchung und solche mit vollendeter Teilung in vier kugelförmige Sporoblasten. Es folgen dann Oocysten mit vier Sporen, letztere mit doppeltkonturierter Kapsel und mit zwei vacuolisierten Sporozoiten im Innern.

Diese Oocysten liegen in ziemlich dicker Lage in ähnlichen Lücken des Bindegewebes wie die früheren Entwicklungsstadien. Nach innen von ihnen reiht sich eine Schichte, welche arm ist an

geformten Elementen und aus Detritus, kleinen Schollen und, wie Untersuchungen am frischen Objekt lehren, aus einer förmlichen Aufschwemmung von Fetttropfchen verschiedenen Kalibers bestehen. Noch weiter nach innen treffen wir dann unter ähnlichem Detritus ebenfalls wieder Tetrasporen, ferner einzelne Sporen, letztere mitunter geöffnet, und auch einzelne Sporenhälften. Aus diesen Bestandteilen besteht auch der weitaus größte Teil der Inhaltsmasse.

Sowohl an Schnitten durch die Schwimmblasenwand mit anhaftenden Protozoenleibern, als auch bei Untersuchung von Quetsch- und Zupfpräparaten von verschiedenen Stellen habe ich mitunter die Jugendstadien in der Schleimhaut vermißt. Demnach sind nicht alle Stellen der Wand gleich produktiv, sondern die Vermehrung ist an gewisse Territorien geknüpft. Wir müssen uns vorstellen, daß sich in diesen Territorien die Merozoiten festsetzen und sich zur Vermehrung anschicken, indem sie zuerst zur agamen Fortpflanzung schreiten. Die bei der sodann beginnenden Sporogonie produzierten Sporen fallen in das Lumen und füllen dasselbe allmählich an.

Durch die Erweiterung der Maschenlücken infolge der Einlagerung der Protozoenleiber nimmt sicher die Mucosa der Schwimmblase an Dicke zu. Anscheinend wächst auch die Anzahl der Bindegewebsfasern, so daß auch dadurch eine Volumszunahme bedingt ist.

Schizogonie.

Meine Beobachtungen über die Schizogonie der vorliegenden Art sind trotz vieler aufgewendeter Mühe leider nicht so erschöpfender Natur wie bei den paradigmatischen Arten. Vor allem lassen die cytologischen Details viel zu wünschen übrig, so daß ich zu einer vollständigen Klarheit nicht gekommen bin.

Sehr häufig, auffallend und schön sind am gefärbten Ausstrich und an Schnittpräparaten die Formen der vollendeten Schizogonie, in welchen die Merozoiten schon ausgebildet sind. Ich will daher die Beschreibung dieser Formen an die Spitze setzen.

Wir treffen hier eine Anordnung in Rosettenform, ähnlich wie sie bei *E. schubergi* beschrieben wird (Taf. 10 Fig. 6, Textfig. A, B).

Während aber bei dieser Art stets ein Restkörper vorhanden ist, vermischen wir hier in der Regel einen solchen, es wird vielmehr die ganze Substanz des Schizonten für die Merozoitenbildung aufgebraucht. Nur ausnahmsweise sitzen die Merozoiten einem kleinen zentralen und undifferenzierten Körper auf.

Die Anzahl der Merozoiten ist meist recht zahlreich. Ich habe an Ausstrichen sowie an Schnittpräparaten über 40 Merozoiten gezählt. Häufig sind mehrere Rosetten vorhanden. Da diese in einer gemeinsamen Höhle liegen und von einer gemeinsamen Membran umgeben werden, ist anzunehmen, daß sie auch einem einzigen Schizonten zugehören, bei welchem bei der Kernteilung sich mehrere Zentren entwickelt haben.

Die einzelnen Merozoiten sind keulenförmig gestaltet, d. h. das eine Ende läuft allmählich und ganz spitz zu, das andere Ende ist abgerundet, und bildet den dicksten Teil des Merozoiten. Die Länge beträgt meist $8\ \mu$ die Breite $2,5\ \mu$. Das Protoplasma läßt in den distalen Teilen mitunter eine grobwabige Struktur erkennen.



Fig. A.



Fig. B.

Der Kern besteht aus einem lichterem, gegen das zentrale Ende gelegenen Hof, welcher mehrere Chromatinbrocken umgibt; mitunter ist das Chromatin zu einem einheitlichen Gebilde (Caryosom?) vereinigt. Diese Konsolidierung scheint der Teilung bei der Schizogonie vorherzugehen. In den Schnittpräparaten erscheinen die reifen Schizonten häufig als rundliche Blasen, in welchen kugelförmige Merozoiten ohne rosettenförmige Anordnung zerstreut sind (Taf. 10 Fig. 7), in solchen Fällen handelt es sich jedenfalls um Anschnitte. Eine Membran ist fast immer deutlich nachweisbar; zwischen ihr und den Merozoiten liegt ein Spalt von verschiedener Breite.

Meist ist entsprechend der multiplen Rosettenbildung die Gestalt des Schizonten eine längsovale. Die Größe kann recht bedeutend sein; im abgebildeten Falle beträgt die Länge $53\ \mu$, die Breite $20\ \mu$.

In einem weiteren Stadium haben sich die Merozoiten aus ihrem Verbande gelöst und in die Gewebslücken zerstreut.

Es beginnt nun, wie es dem Schema entspricht, die Weiterentwicklung nach drei verschiedenen Richtungen: die Ausbildung von Schizonten, von Macrogameten oder von Microgametocyten. Wir wollen uns mit der Ausbildung der Schizonten befassen, soweit uns darüber das Material Aufschlüsse gibt.

Die Kernvermehrung (Taf. 10 Fig. 2—4) beginnt schon bei sehr

jugen Individuen (von $9,5 \mu$ Länge). Der Merozoit hat sich zu einem ovalen Gebilde abgerundet. Die Chromatinbröckeln haben sich zu einem einheitlichen Binnenkörper vereinigt, der in die Teilung eingeht. Das Caryosom wird queroval, die beiden Pole rücken auseinander, das Verbindungsstück wird undeutlich und verschwindet.

Kernteilungsfiguren mit „Zwischenkörper“ und „Nucleolocentrosom“, wie sie SCHAUDINN bei *E. schubergi* beschrieben hat, konnte ich nicht beobachten. Eine Kernsafthöhle vermißte ich hier ebenfalls, ebenso auch einen Außenkern.

Die weiteren Kernteilungen scheinen sehr rasch abzulaufen, da wir wohl zahlreiche vielkernige Stadien, aber wenige Formen mit einer geringen Kernanzahl finden. Außer Hantelformen sind keine Übergänge vorhanden.

Die Tochterkerne sind annähernd gleich groß. Schon bei der Zweikernigkeit sind Vacuolen in den Schnittpräparaten zu beobachten, von Fetttropfen herrührend. Mit zunehmender Kernanzahl wächst auch der Schizont. Die Tochterkerne sammeln sich in einer zirkulären Zone.

Wir finden ferner Stadien, in welchen die Tochterkerne eine ähnliche Auflockerung zeigen (Taf. 10 Fig. 5), wie sie REICH bei *E. stiedae* und JOLLOS bei *Adelea ovata* beschrieben hat. Die Tochterkerne bestehen dann aus Chromatinkörnern, welche durch ein Fadenetz miteinander in Verbindung stehen.

Später scheint es wieder zu einer Aneinanderlagerung der Chromatinelemente zu kommen, da wir im Kern der Merozoiten schon einfachere Verhältnisse treffen. Die Bedeutung des Vorganges ist mir nicht verständlich. An der Oberfläche des Schizonten hat sich inzwischen ein deutliches Häutchen differenziert. Da die Schizogonie in den Gewebsmaschen abläuft, kann diese Membran nur ein Ausscheidungsprodukt des Parasiten sein. Die Abschnürung der Merozoiten geschieht in der Weise, daß sich ebenso wie bei *E. schubergi* um jeden Tochterkern ein heller Hof etabliert, der je einen Kern samt einem Protoplasmasaum von der Umgebung trennt.

Diese Merozoitenbildung kann sukzessive vor sich gehen, so daß in der einen Partie des Schizonten schon fertige Merozoiten vorhanden sind, während andere Partien noch keine Veränderung zeigen.

Kernteilungen spielen sich auch häufig in anderer Weise ab. Wir treffen gar nicht selten stabförmige Tochterkerne (Textfig. C) welche zum Teil radspeichenartig um ein Zentrum angeordnet sind. Außer den Stabkernen sind noch Chromatinkörnchen zentralwärts

vorhanden. Ich konnte nicht eruieren, ob diese Körnchen Beziehungen zur weiteren Teilung besitzen. Möglicherweise hängt eine Modifikation der Merozoitenbildung damit zusammen, bei welcher viel schmalere Merozoiten gebildet werden, deren Enden von vornherein sich an der Oberfläche buckelförmig vorwölben, was wir bei dem erstbeschriebenen Modus nicht finden. Auffallend ist die starke Färbbarkeit dieses Gebildes, welche eventuell für eine Zugehörigkeit zur Microgametocytenbildung sprechen würde. Die stabförmigen Chromatinteile müßten dann der Quere nach zerfallen und die Kerne der Microgameten bilden. Vielleicht handelt es sich jedoch um eine geschlechtliche Differenzierung der Agameten, analog den Vorgängen bei *Cyclospora caryolytica*.



Fig. C.

Noch interessanter sind Bilder, welche mir in Hamburg angefertigte Ausstriche boten. Die Präparate stammten von Partien des Inhaltes, welche eine eigentümliche rötliche Färbung aufweisen.

Ich fand hier zahlreiche Oocysten, welche zum Teil die Sporozysten schon entleert hatten. Letztere lagen noch innerhalb der Oocystenhülle, ließen daher jede Verwechslung mit Merozoiten als ausgeschlossen erscheinen. Es ist nun auffallend, daß diese Sporozysten schon bei Verlassen der Sporenhülle häufig eine Mehrkernigkeit aufweisen. Zahlreiche Übergänge führen zu Stadien, welche zweifellos als solche der Schizogonie anzusprechen sind. Die feineren Verhältnisse sind folgende:

Die Sporozysten unserer Form zeichnen sich dadurch aus, daß sie innerhalb einer Kernhöhle einen rundlichen chromatischen Binnenkörper, ein Caryosom, besitzen. Sie sind anfangs lang gestreckt, später werden sie kürzer, gedrungener.

Es setzt nun eine lebhaftere Kernteilung ein, und zwar sehen wir vielfach seitlich einen kleineren Tochterkern sich abtrennen. In einzelnen Fällen sind beide Kerne durch eine Centrodosome verbunden (Taf. 10 Fig. 8, 9). Die weitere Kernvermehrung geht ohne eruierbare mitotische Vorgänge einher. Der Schizont, als den wir dieses Stadium bezeichnen müssen, wächst heran und wird immer plumper. Die flaschenförmige Gestalt, id est das zugespitzte Vorderende verrät jedoch die Abstammung von einem Sporozysten. Die Ausbildung der Merozoiten geht unter Abschnürung von Protoplasmamassen um die Tochterkerne einher, so daß schließlich

der Schizont ganz gefüllt ist mit zahlreichen, von einem hellen Hof umgebenen Tochterkernen.

Wir finden ferner in demselben Präparate eigentümliche Formen, welche den Gedanken nahe legen, daß sich vielfach degenerative Prozesse abspielen. So sind mitunter die Sporozoiten der Quere nach gleichmäßig verbreitert (Textfig. D). Das Chromatin ist unregelmäßig verteilt, mitunter sind in Längsreihen gestellte Stäbchen und Körner vorhanden, so daß man an eine beginnende Längsteilung denken könnte.

Mitunter sind aber auch die Sporozoiten enorm in die Länge gewachsen und sehr verdünnt ($32 \mu : 3,2 \mu$). Sie können einkernig sein, oder es sind eine ganze Anzahl von Kernen vorhanden, welche hintereinander liegen und einen deutlichen Hof zeigen (Taf. 10 Fig. 10). Der Zwischenraum zwischen den Kernen ist grob vakuolisiert. Daß sich aus solchen Gebilden Merozoiten entwickeln, erscheint mir nichtwahrscheinlich, da eine Merozoitenbildung durch Querteilung kaum anzunehmen ist. Es sind auch keine Bilder vorhanden, welche diese Annahme rechtfertigen würden. Wir müssen demnach vermuten, daß zwar die Sporozoiten die Möglichkeit besitzen, sich agam in derselben Schwimmblase fortzupflanzen, daß aber die Teilung sehr häufig nicht zu Ende geführt wird, die Gebilde vielmehr zum Teil absterben. Anscheinend gehen überhaupt eine große Anzahl von Entwicklungsformen zugrunde. Die große Menge von Detritus ist kaum als etwas anderes als eine Summe von Zerfalls- und Abfallsprodukten aufzufassen. Bei der überaus lebhaften Fortpflanzung kann uns dies nicht wundernehmen. Degenerationsprozesse und ein Absterben von Individuen werden übrigens auch bei den übrigen Coccidien in verschiedenen Stadien beobachtet.



Fig. D.

Microgametenbildung.

Wir wollen hier ebenfalls von der Beschreibung der reifen Microgametocyten ausgehen. Es sind dies längsovale bis kugelige Gebilde mit ziemlich starker Färbbarkeit, mit nicht feiner vacuolisiertem Protoplasma. Der Körper zeigt mitunter Einbuchtungen, im Innern sind häufig noch stärker färbbare Brocken sichtbar.

Die Microgameten sind sehr fein, haarförmig, leicht gewellt (spirochätenartig). Sie ähneln den Microgameten der Malaria-plasmodien viel mehr als denen der Coccidien (Taf. 10 Fig. 14, 15).

Sie wurzeln mit einer Chromatinverdichtung im Körper des Microgametocyten. Letzterem liegen sie anfangs vollständig an der Oberfläche an; bei ihrer parallelen Anordnung und dem leicht gebogenen Verlaufe erzeugen sie das Bild eines Haarschopfes oder Spinnrockens. Später heben sie sich von der Unterlage ab und bilden eine aus einem Gewirr von feinsten Fäden bestehende Hülle. Sie können sich aber auch vollständig strecken und ähneln dann sehr feinen, aber starren Borsten, welche senkrecht von dem großen Restkörper nach allen Seiten abstehen. Ihre Länge läßt sich mit 17μ feststellen, sie übertreffen also an Länge alle übrigen Microgameten.

Geißeln konnte ich weder am gefärbten Ausstrich- und Schnittpräparat, noch im Nativpräparat wahrnehmen.

Überhaupt zeigen die Microgameten, abgesehen von dem Basalkorn keine Differenzierung, ihre Färbbarkeit ist nur eine mäßige. Das Basalkorn scheint bei der Ablösung im Restkörper zu bleiben. Ich konnte wenigstens an den freien Microgameten keine Chromatinanhäufung konstatieren.

Diese anscheinende Kernlosigkeit ist jedenfalls sehr bemerkenswert, jedoch verständlich, wenn wir den ganzen Microgameten als ein Gebilde auffassen, in welchem die Kernsubstanz diffus verteilt ist. Die Ähnlichkeit mit den Spirochäten würde demnach keine rein äußerliche sein.

Die Anzahl der Microgameten schätzte ich in einem Präparate auf über 100, sie ist also recht beträchtlich.

Im Gewebe sind sie nach ihrer Ablösung von dem Bildungskörper, der später als großer Restkörper zurückbleibt, nicht immer leicht von den ebenfalls feinen Bindegewebsfibrillen zu unterscheiden. Sie liegen oft diffus im ganzen Gewebe als gekrümmte Fäserchen zerstreut. Mitunter sind sie an umschriebenen Orten angeläuft. Ich konnte sie in dieser Weise auch im frischen Präparate beobachten.

Bei der nächsten Vorstufe treffen wir eine große Anzahl von spindelförmigen Kernen, welche größtenteils tangential gestellt sind. Übergänge tun dar, wie diese Spindeln sich allmählich in die Länge strecken und sich zu den Microgameten umformen, welche somit auch nach diesen Bildern aus reiner Chromatinsubstanz zu bestehen scheinen (Taf. 10 Fig. 13).

Als Vorstadium für diese Entwicklungsstufe betrachte ich Gebilde, bei welchen zahlreiche kleine Tochterkerne an der Peripherie gelagert sind (Taf. 10 Fig. 12). Diese Tochterkerne setzen sich jedoch aus Chromatinkrümmeln zusammen, welche insofern häufig eine gewisse Regelmäßigkeit in der Anordnung zeigen, als ein kleines mehr

gestrecktes Krümel tangential liegt, während senkrecht hierzu in der Mitte und nach innen ein zweites Chromatinkorn sichtbar ist. Möglicherweise ist letzteres als Reduktionskörper aufzufassen.

Als Anfangsstadien der Microgametocytenbildung betrachte ich folgende Formen:

Es tritt bei oviden Coccidien von 13μ Länge und 10μ Breite, welche zweifellos aus Merozoiten sich entwickelt haben, bei nach HEIDENHAIN gefärbten Präparaten eine starke Tingierbarkeit des Protoplasmas auf. Letzteres enthält außerdem zahlreiche chromatische Granula von verschiedener Größe und Gestalt. Das Caryosom, welches bei früheren Formen rein kuglig ist und einen ziemlich konstanten Durchmesser von $2,5 \mu$ aufweist, ist zu einem stark färbbaren quereovalen Körper mit einem größten Durchmesser von $5,5 \mu$ herangewachsen (Taf. 10 Fig. 11).

Die Weiterentwicklung, welche zum Teil auch zur Ansicht kam, ist von einem Wachstum des ganzen Gebildes begleitet. Das Caryosom wird unregelmäßig, stößt zahlreiche chromatische Granula aus und zerfällt schließlich in kleine Körnchen, welche anfangs im ganzen Zelleib zerstreut sind und sich später an der Oberfläche in Körnchengruppen ansammeln. Von diesen werden auch Sternformen beobachtet, wie bei *E. schubergi*. Durch Konsolidierung der Körnchengruppen und durch Streckung der Tochterkerne resultieren dann jene Formen, welche wir eingangs als unzweifelhafte Microgameten kennen gelernt haben.

Die als Anfangsstadien beschriebenen Formen habe ich zuerst als Kunstprodukte aufgefaßt. Die Häufigkeit des Auftretens auch dort, wo in der Umgebung die Färbung ganz distinkt und gut differenziert war, bestimmte mich, auch diesen Formen einen Platz in der Entwicklungsgeschichte anzuweisen, und da die Produktion der Microgametocyten beherrscht und bedingt wird von einer bedeutenden Vermehrung der Kernsubstanz, insbesondere des Chromatins, so passen diese Formen wohl nur an diese Stelle. Auffallend ist die starke Beteiligung des Caryosoms bei der Chromatinvermehrung. Das Caryosom nimmt dabei an Umfang außerordentlich zu, scheint aber zugleich Chromatin in flüssigem Zustande an die Umgebung abzugeben, wodurch die starke Färbbarkeit des Protoplasmas zustande kommt. Erst wenn das Caryosom eine gewisse Größe erreicht hat, zerfällt es. Ob das in Textfigur C gezeichnete Stadium hierhergehört, ist nicht sicher (vgl. Schizogonie).

Gegenüber anderen Coccidien ergaben sich wesentliche Unterschiede, indem bei *E. schubergi* das Chromatin des Außenkerns

die Hauptrolle spielt, während bei *Cyclospora caryolytica* ebenfalls das Caryosom in den Vordergrund tritt, jedoch nicht heranwächst, sondern sich sukzessive teilt. Am ehesten stimmt unsere Form, wenn wir die Untersuchungen von REICH vergleichen, mit *E. stiedae* überein, besonders was die Abbildungen betrifft.

Macrogameten.

Die Macrogameten sind jene Formen, welche neben den Tetrasporen am meisten im Nativpräparate auffallen. Es sind meist große, stark granulierte Kugeln, welche vermöge der starken Granulierung im ungefärbten Zustande einen Kern kaum erkennen lassen. Nur mitunter deutet ein heller Fleck seine Lage an (Taf. 10 Fig. 27—29, Textfig. E). Die Granulierung wird einerseits durch größere, stark



Fig. E.

lichtbrechende Tropfen hervorgebracht, welche sich als aus Fett bestehend erweisen, andererseits durch viel kleinere, ebenfalls, aber etwas weniger lichtbrechende Körnchen von $0,8 \mu$ Durchmesser, welche den Reservestoffkörnern oder plastischen Granula der übrigen Coccidien an die Seite zu stellen sind. Sie färben sich ebenso wie diese mit Jod gelb, sind aber bedeutend kleiner. Die Macrogameten sind von einer homogenen Zone von anscheinend gallertiger Substanz umgeben, da sie bei Verschiebungen des Deckglases immerhin eine ge-

wisse Widerstandsfähigkeit bewahrt. Sie enthält größere Tropfen suspendiert, nach außen ist sie von einer deutlichen Membran begrenzt.

Der Durchmesser der Macrogameten beträgt durchschnittlich 20μ , samt der Zone 26μ .

Die kuglige Gestalt erhalten die Macrogameten erst im Laufe der Entwicklung aus den mehr länglichen jungen Formen.

Im gefärbten Zustande zeigt der Kern der Macrogameten die Eigenschaften eines Caryosomkernes. Das Chromatin erscheint in nach HEIDENHAIN gefärbten Präparaten fast vollständig in einem homogenen, tropfenartigen, scharf begrenzten und kugligen

Binnenkörper von $2\ \mu$ Durchmesser aufgestapelt. Die Kernsaftzone ist meist deutlich ausgeprägt, breit und scharf gegen das Protoplasma begrenzt. Ein Außenkern ist nicht nachzuweisen. Bei Hämatoxylin- und Safraninfärbung konnte ich mitunter im Bereiche des Caryosoms noch ein tiefer tingiertes Korn (Centriol?) wahrnehmen (Taf. 10 Fig. 29). Es ist fraglich, ob die in Taf. 10 Fig. 18 den intensivst gefärbten Innenkörper umgebende, blässere Zone als Teil des Caryosoms (Plastin) aufzufassen ist. Dieses Caryosom würde sonach der einfachsten Stufe der von HARTMANN aufgestellten Gruppe der Caryosomkerne, wie sie sich bei den Amöben finden, entsprechen. Das Centriol wurde allerdings nicht einwandfrei nachgewiesen.

Die Kernsaftzone zeigt meist keine besondere Struktur, nur mitunter gehen Fäden vom Caryosom gegen das Protoplasma. Mitunter sind in ihrem Bereiche scharf begrenzte Chromatinkörnchen sichtbar. Eines davon erschien mir sehr konstant. Ob ihm irgendeine besondere Bedeutung zukommt, konnte ich nicht feststellen. Mitunter sendet die Kernsaftzone Zipfeln in die Umgebung; macht also einen amöboiden Eindruck.

Das Protoplasma läßt auch am gefärbten Präparate eine alveoläre Struktur vermissen. Die Granula erfüllen in dichter Aneinanderlagerung den ganzen Zelleib, soweit er nicht von Fetttropfen eingenommen ist. Letztere erscheinen in mit ätherischen Ölen oder Äther behandelten Präparaten als Vacuolen. In Trockenausstrichen sieht man bei der Färbung nach Giemsa ein regelmäßiges, sehr feines, blasses Netzwerk, dessen rundliche, ungefärbte Lücken von den plastischen Granula gebildet wird. Letztere scheinen somit von einer plasmatischen Kittsubstanz zusammengehalten zu werden. Über das Vorhandensein von Fett wird später noch ausführlicher gesprochen werden. Eine distinkte Zellmembran ist an der Peripherie des Cytoplasmas nicht nachweisbar. Wir sehen vielmehr nicht selten in Ausstrichen aus den Macrogameten, jedenfalls infolge eines erlittenen Druckes, plastische Granula aus dem Protoplasma austreten, ohne daß eine Rißstelle in einer Hüllmembran sichtbar wäre.

Neben diesen beiden Formen von Einlagerungen treten im Cytoplasma noch zahlreiche chromatische Granula auf. Sie sind fast durchwegs sehr fein; besonders reichlich sind sie in der Umgebung des Kerns vorhanden (Taf. 10 Fig. 11). Nie sind sie so zahlreich wie bei *E. stictae*.

Mitunter sieht man in den Schnittpräparaten Macrogameten in sternförmigen feingekörnten Gebilden, welche Bindegewebszellen

ähneln, eingelagert (Taf. 10 Fig. 16). Viel häufiger ist aber die Einlagerung in die oben beschriebene hyaline Substanz, welche mantelartig die Macrogameten umgibt. Diese Schicht findet sich übrigens nicht bloß bei den Macrogameten, sondern auch bei anderen Entwicklungsstadien (Schizonten). Der Umstand, daß sie auch im frischen Präparate und zwar hier besonders schön sichtbar ist, schließt den Verdacht aus, daß es sich bloß um ein Kunstprodukt, hervorgerufen durch Schrumpfung bei der Fixierung, handle. Ich fasse sie als ein Produkt des Parasiten auf und stelle mir vor, daß derselbe eine Flüssigkeit ausscheidet, welche an der Berührungsfäche mit der Gewebsflüssigkeit zu einer Membran erstarrt. Diese äußere Grenzmembran erscheint nur an frischen Präparaten vollständig glatt, an fixierten Objekten ist sie gerunzelt.

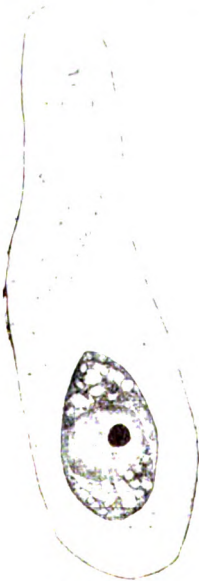


Fig. F.

An solchen Objekten ziehen vielfach Stränge von der Grenzmembran zur Macrogametenoberfläche, welche untereinander in Verbindung stehen. Sie sind wahrscheinlich Artefakte, welche durch die Konservierung entstanden sind. Auch eine globalveoläre Struktur ist mitunter nachweisbar (Textfigur F). Mit Eosin färbt sich diese Zone rötlich, mit Eisenhämatoxylin grau. Es erscheint naheliegend, dieser intermediären Schicht, welche durch eine Sekretion des Parasiten zustande gekommen ist, eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Coccidien zuzuerkennen.

Sehr bemerkenswert ist ferner das Auftreten von Tropfen in dieser Schicht. Diese verhalten sich gegenüber Kernfarbstoffen wie Chromatin. Besonders intensiv färben sie sich mit Eisenhämatoxylin, weniger stark mit Hämalaun (Taf. 10 Fig. 17, 18). Man möchte sie demnach für Gebilde halten, welche aus dem Kern ausgestoßen wurden. Austritt von Chromatin in Tropfenform aus dem Caryosom hat *SCHAUDINN* auch bei *E. schubergi* und zwar bei der Reifung beschrieben. Derselbe Prozeß kann jedoch hier kaum mitspielen, denn einerseits sind diese Tropfen zum Teil größer als das Caryosom, andererseits treten solche Tropfen an der Peripherie auf, während das Caryosom anscheinend noch gar nichts von seiner Substanz eingebüßt hat. Wo demnach diese Substanz gebildet wird, ist mir nicht klar.

Reifung und Befruchtung der Macrogameten.

Die Entwicklung der Macrogameten zur Oocyste erfordert tiefgreifende Veränderungen, welche von der Reifung und Befruchtung beherrscht werden. Für erstere ist die Verringerung und Ausstoßung des Chromatins charakteristisch. Bei *E. schubergi* wird das ganze Caryosom ausgestoßen und verläßt in Tropfenform den Coccidienleib. Bei *Cyclospora caryolytica* teilt sich das Caryosom, ähnlich auch bei *Adelea ovata*, bei *Adelea zonula* verläßt das Chromatin das Caryosom ¹⁾ in gelöstem Zustand.

Auch bei unserer Form kommt es zur Ausstoßung von Chromatinsubstanz, welche jedoch hier so weit geht, daß in Macrogameten, die sich zur Teilung in die Sporoblasten anschicken, also schon als Oocysten zu bezeichnen sind, weder von größeren Chromatinbrocken, noch überhaupt von einem Kerne etwas zu sehen ist.

So wie bei *Cyclospora caryolytica* löst sich auch hier das Caryosom in Partikeln auf. Die Trennung derselben voneinander erfolgt jedoch unter verschiedenen Modalitäten (Taf. 10 Fig. 19—23). Wir beobachten folgende Bilder:

a) Das Caryosom verliert seine regelmäßige Umgrenzung, an einer Stelle tritt ein knospenartiger Vorsprung über die Oberfläche hervor, der sich abschnürt.

b) Das Caryosom ist von einer ganzen Zone von Chromatinkörnern umgeben.

c) Das Caryosom hat sich in zwei Partien geteilt, von welchen sich die eine noch weiter in Körner aufgelöst hat.

d) Von den chromatischen Elementen hat sich ein Teil in Form einer queren Platte aneinander gelagert.

e) Die Chromatinkörner haben sich in zwei Reihen, ähnlich Chromosomen, gelagert. Fast immer ist bei diesen Formen die Kernsafthöhle in die Länge gezogen, die Begrenzung wird undeutlich. Welche Elemente schließlich zurückbleiben, ist nicht klar. Zum mindesten muß das Idiochromatin in irgendwelcher Form (Centriol) vorhanden bleiben.

Auch über die Befruchtung konnte eine Klarheit nicht erzielt werden. Im frischen Präparate fallen Macrogameten auf, in welchen der granuliert Inhalt in einen zitzenartigen, körnchenarmen Fortsatz ausläuft, der sich durch die hyaline Zone bis zur Oberfläche

¹⁾ HARTMANN bezeichnet übrigens das von MOROFF als Caryosom aufgefaßte Gebilde als einfachen Nucleolus und das „Nucleolocentrosom“ als Caryosom.

erstrecken kann. Es ist naheliegend, diese Formation als Empfängnishügel anzusprechen (Taf. 10 Fig. 28). Am fixierten und gefärbten Präparat sieht man häufig ähnliche Bilder wie sie von REICH und METZNER für *E. stiedae* abgebildet werden, nämlich eine pseudopodienartige Streckung des Kernes gegen die Oberfläche zu und in diesem Schlauch Chromatinklumpchen. Den Eintritt von Microgameten, sowie das Vorhandensein von männlichen Kernelementen in Macrogameten habe ich nicht beobachten können. Möglicherweise erschwert die Feinheit der Microgameten die Untersuchung. An konservierten und gefärbten Präparaten sind wohl mitunter Formen sichtbar, bei welchen sich durch die Substanz des Macrogameten quer eine spindelförmige Differenzierung erstreckt, welche sich von der granulierten Umgebung abhebt (Kernspindel?). Andererseits kommen mitunter Formen vor, bei welchen die Oberfläche an einer Stelle eine Einbuchtung zeigt, genabelt ist. Einmal sah ich auch aus der Umgebung einen dünnen Faden, der möglicherweise ein Microgamet ist, gegen diese Stelle hinziehen.

Die Sporenbildung.

Die Sporenbildung läßt sich in ihren groben Umrissen am Nativpräparate sehr gut verfolgen, da sich an den geeigneten Stellen der peripheren Partien einschlägige Stadien der verschiedensten Entwicklungsstufen überaus reichlich vorfinden.

Der Zerfall in die vier Sporoblasten manifestiert sich in kugligen Vorwölbungen an der Oberfläche, in deren Inneren hellere Streifen die dichtgekörnten Abschnitte trennen. Ein Restkörper ist in der Regel nicht zu beobachten, es wird vielmehr der ganze Inhalt aufgebraucht, höchstens bleiben an der Oberfläche, dort wo die Sporoblasten aneinander stoßen, einzelne Körner von der Teilung ausgeschlossen. Nur einmal kam neben den vier Sporoblasten ein fünfter, kleinerer Protoplasmaaballen zur Ansicht (Taf. 10 Fig. 30). Diese Inkonstanz würde der Restkörperbildung die systematische Bedeutung nehmen.

Die Sporoblasten besitzen demnach an den Berührungsstellen ebene Flächen und wenden dem Zentrum eine Spitze zu.

Das von METZNER bei *E. stiedae* beschriebene Pyramidenstadium der Sporoblasten, bei welchem hyaline Spitzen nach außen gekehrt werden, konnte hier ebensowenig beobachtet werden, wie ein SCHNEIDER'sches Spitzenkörperchen.

Im weiteren Verlaufe werden die Sporoblasten rein kuglig. Sie besitzen einen Durchmesser von $9,6 \mu$ (Textfig. G). Sie trennen sich

dann voneinander und liegen frei in der hyalinen Hülle. Dieser Befund läßt ebenfalls schließen, daß die Macrogameten überhaupt keine eigene Hülle hatten. In diesem Stadium sehen wir schon am Nativpräparate eine rundliche, distinkte Stelle im Innern der granulierten Kugeln, die jedenfalls dem Kern entspricht. Auch am gefärbten Präparate sind nun chromatische Kernelemente, undeutliche Kerne mit sehr kleinem Caryosom (Taf. 10 Fig. 30), in den Sporoblasten wahrzunehmen. Nicht immer bilden sich vier Sporoblasten aus. Mitunter sind bloß zwei vorhanden, welche entweder gleich

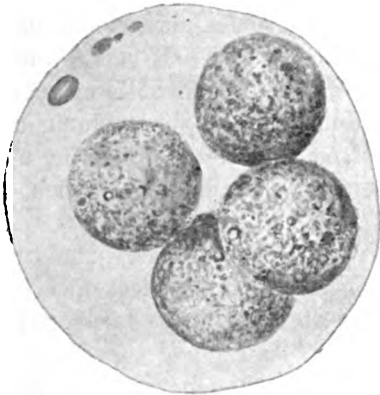


Fig. G.

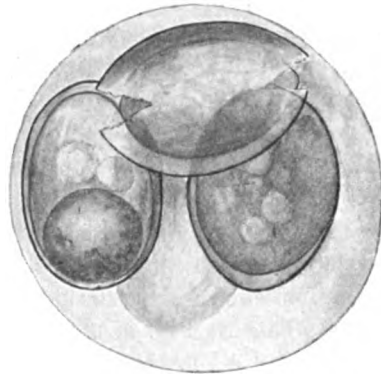


Fig. H.

sind, oder der eine ist sehr groß, der andere viel kleiner. Solche Sporoblasten scheinen insgesamt dem Untergange geweiht zu sein, da ich Sporen am Entstehungsorte nur immer in der Vierzahl antraf.

Die Umwandlung der Sporoblasten in die Sporen manifestiert sich am Nativpräparate durch ein Hellerwerden des Inhaltes und die Ausbildung der Kapsel. Die gleichmäßige Körnung der Sporoblasten schwindet. Es treten dafür in geringer Anzahl stark lichtbrechende Kugeln von verschiedener Größe auf, welche aus Fett bestehen (Textfig. H). Ob diese Fetttropfen den bei *E. schubergi* beschriebenen 8 großen, stark lichtbrechenden Tropfen in der Oocyste entsprechen, kann ich nicht entscheiden. Es ist kaum anzunehmen, daß einem so gewiegten Beobachter wie SCHAUDINN die Fettnatur hätte entgehen können. In der Zirkumferenz scheidet sich eine doppelt konturierte, distinkte, dicke Membran, die Sporenkapsel, ab. Schon nach diesem Befund ist zu schließen, daß die Granula zum Aufbau der Kapsel verwendet werden. Bei der

Färbung nach HEIDENHAIN erscheinen stark gefärbte Brocken peripher angeordnet, als ob sie sich zur Kapsel ausbreiten wollten. Bemerkenswert ist die starke Färbbarkeit der ausgebildeten Kapsel mit Eisenhämatoxylin, welche die Sporen meist als schwarze Körper erscheinen läßt, die keinen Einblick in ihren Inhalt gewähren.

Die Umwandlung in Sporen vollzieht sich nicht immer an sämtlichen Sporoblasten gleichzeitig. Mitunter sind ein bis zwei Sporoblasten noch granuliert und kapsellos, während die übrigen schon Sporennatur besitzen. Anfangs sind die Sporen kuglig, so wie die Sporoblasten, später nehmen sie, jedenfalls mit der Ausbildung der Sporozoiten, die Gestalt eines Rotationsellipsoides an. Sie besitzen dann eine Länge von 11—12,5, eine Breite von 7,5—9,5 μ . Anfangs sind sie noch von einer hinfalligen Hülle, der Oocystenhülle umgeben, welche so dünn ist, daß sie sich den Konturen der Sporen innig anschmiegt und kaum wahrzunehmen ist. Später fehlt die Hülle, und die Sporen liegen frei. Solche Formen finden sich vornehmlich in der Mitte der Schwimmblasenhöhle.

In der Hülle sind die Sporen verschieden gelagert, bald zu zweien in Form eines Doppelkreuzes, bald drei in Dreiecksform, so daß sich die Enden berühren. Die vierte Spore ist darüber gelagert (Taf. 10 Fig. 25).

Auch die Umwandlung des Sporenhaltes zu den zwei Sporozoiten konnte nicht verfolgt werden, da die Färbemittel schwer eindringen. Sie scheint jedoch sehr rasch vor sich zu gehen, da wir dicht nebeneinander Sporoblasten und Sporen mit ausgebildeten Sporozoiten antreffen. Auf Schnittpräparaten sehen wir die Ausbildung eines Längsspalt, der den Protoplasmahalt der Länge nach trennt, so daß die Enden noch zusammenhängen. Einen Restkörper habe ich auch hier nie beobachtet. Die Sporozoiten sind 16 μ lang und 4 μ breit, sie sind also bedeutend länger als die Spore. Beide Enden sind verjüngt, daß vordere ist mehr schlank und zugespitzt, das Hinterende plumper und endigt stumpf. Um im Sporenraum Platz zu finden, sind sie im vorderen Anteil abgeknickt. Sie liegen entweder so ineinander verschränkt, daß das Hinterende des einen Sporozoiten in der Umbiegungsstelle des anderen liegt, oder der eine Sporozoit liegt in der Längsachse, der andere, teilweise um ihn gewunden, senkrecht zu ihm in der Querachse (Taf. 10 Fig. 26 a u. b). Nach den Angaben der Autoren fehlt der Restkörper bei den meisten Fischcoccidien. Dieser Mangel wurde als Kardinalmerkmal des Genus *Goussia* hingestellt. Daß der Restkörper nicht bei allen Fischcoccidien fehlt, davon habe ich mich bei einer

revidierenden Musterung von Präparaten der *E. subepithelialis* überzeugen können.

Nach dem Verlassen der Spore strecken sich die Sporozoiten aus. Es kommen dann auch die Strukturverhältnisse am gefärbten Präparate gut zur Ansicht. Sie besitzen beiläufig in der Mitte eine Kernsafthöhle und in der Mitte derselben ein Caryosom. Mitunter liegt, umgeben von einer helleren Zone, in der Mitte ein ovales Gebilde und an dessen vorderem Ende das Caryosom. Die Zeichnung ähnelt der von JOLLOS für die männlichen Schizonten von *Adelea ovata* in Fig. 21 gegebenen Abbildung (Textfig. J). Wahrscheinlich ist dieses ganze Gebilde als ein Caryosom aufzufassen, bei dem nur im vorderen Anteil Chromatin eingelagert ist, während der übrige Körper aus Plastin besteht. Auffallend sind im Protoplasma die mehrfachen Vacuolen, welche die ganze Breite des Sporozoiten einnehmen, ja sich noch an den Grenzkonturen vorwölben. Sehr häufig sind ein bis zwei vor dem Kern und eine hinter dem Kern vorhanden. Sie enthalten Fett. Der Besitz eines Caryosoms ist eine Eigentümlichkeit dieser Sporozoiten. SCHAUDINN hebt ausdrücklich den Mangel eines solchen bei *E. schubergi* und *Cyclospora caryolytica* hervor. Er findet vielleicht seine Begründung in der eingangs angeführten Eigenschaft, noch in derselben Schwimmblase, gleich nach dem Verlassen der Spore zur ungeschlechtlichen Fortpflanzung zu schreiten.



Fig. J.

Die Sporen öffnen sich mit einer Längsnaht nach Art einer Schote. Die Längsnaht ist anfangs bloß als Spalt, der in der Verbindungslinie der beiden Pole verläuft, sichtbar. Obwohl sie an der unversehrten Spore nicht ausgeprägt ist, dürfte sie schon in der Schalensubstanz vorgebildet sein.

Die Sporozoiten verlassen sodann die klaffenden Sporenhälften und begeben sich nach außen. Sie tun das mitunter noch zu einer Zeit, in der die Oocystenhülle noch intakt ist, und sammeln sich dann in dem Spalt zwischen letzterer und den Sporen (Taf. 10 Fig. 25). Solche Fälle sind deshalb wichtig, weil hier kein Zweifel obwalten kann, daß es sich tatsächlich um Sporozoiten, und nicht um Merozoiten handelt, von welchen sie sich freilich auch durch ihre Größe unterscheiden. Das Ausschlüpfen der Sporozoiten dürfte wohl aktiv erfolgen, da sonst eine treibende Kraft, welche die Sporozoiten aus ihrem Lager nach auswärts befördern würde, wenigstens bei den noch mit der Oocystenhülle versehenen Sporen, nicht vorhanden ist.

Im letztgenannten Falle haben die Sporozoiten außerdem diese

Hülle zu passieren. Bei der Hinfälligkeit derselben dürfte dies keinen Schwierigkeiten unterliegen.

Welche Umstände die Sporenkapseln in der Schwimmblase zum Klaffen bringen, ist unklar, nachdem die Wirkung der Verdauungssäfte, welche bei den übrigen Coccidien dieses Geschäft besorgt, wegfällt. Auch hierin liegt eine bemerkenswerte Eigenheit dieser Coccidien. Wie schwer ist es doch sonst, künstlich die Sporen von Coccidien und Myxosporidien zum Platzen zu bringen!

Einige Maße der Entwicklungsstadien.

Merozoit: 8 μ lang, 2,5 μ breit.

Reifer Schizont: 53 μ lang, 20 μ breit.

Junger Schizont: 9,5 μ lang.

Reifer Microgametocyt: 22,5 μ lang, 6 μ breit.

Microgamet: 17 μ lang.

Reifer Macrogamet: 20 μ , samt hyaliner Zone 26 μ im Durchmesser.

Sporoblast: 9,6 μ im Durchmesser.

Spore: 12 μ lang, 9 μ breit.

Sporozoit: 16 μ lang, 4 μ breit.

Menge der Sporen.

Um eine Vorstellung über die Anzahl der in einer Schwimmblase vorhandenen Sporen zu erhalten, wurde ähnlich der Blutkörperchenzählung mit dem THOMA-ZEISS'schen Apparate vorgegangen. Ich wog mir von dem frischen Schimmbblaseninhalte auf einem Objektträger 0,1 g ab. Ich fügte ein großes Deckglas darauf, so daß die Masse mit dem Rande des Deckglases abschloß. Das Deckglas teilt ich durch feine Tintenstriche in Quadrate. Ferner trug ich auf die Glasscheibe des Okularmikrometers mit Tinte ebenfalls Quadrate auf. Letztere eichte ich unter Zuhilfenahme des Kreuztisches, so daß ich schließlich dem Flächenwert eines Quadrates des Okularmikrometers erhielt.

Nun wurden an verschiedenen Stellen des Präparates Zählungen vorgenommen. Ich erhielt für 0,1 g eine Zahl von rund 250,000 Tetrasporen, also 1 Million Sporen. Wenn ich das Gewicht des Inhaltes einer ganz gefüllten Schwimmblase mit rund 100 g beziffere, so beträgt also die Anzahl der Sporen 1 Milliarde.

Wenn auch manche Partien ärmer sind an Sporen und daher diese Zahl vielleicht etwas zu hoch gegriffen ist, so bekommen wir

doch einen Begriff von der ganz enormen Sporenmenge. Die lebhafteste Vermehrung, die wir allerorten fanden, ließ ein solches Resultat wohl voraussetzen.

Wir wissen nun zwar nicht, wie stark die Infektion in der Regel ist, auch nicht ob die Infektion eine oftmalige ist. Auf jeden Fall ist das Fortpflanzungsvermögen imponierend.

Chemische Zusammensetzung des Schwimmblaseninhalts.

Es wurde schon eingangs darauf hingewiesen, daß das Vorkommen einer so großen Anzahl von Protozoenleibern in einem Behälter eine kaum sonst wiederzufindende Gelegenheit zur chemischen Untersuchung darbietet. Ich will daher kurz über die Resultate der mühevollen Untersuchungen, welche Herr Professor PANZER angestellt hat, berichten.

Die erste Untersuchung wurde an einem Material von 516 g gemacht, welche von fünf Köhlern stammte. Einzelne Schwimmblasen enthielten 170, 160 und 100 g.

Die chemische Analyse ergab in Prozenten:

Wasser	89,93	Proz.
Feste Stoffe	14,07	Proz.
Organische Stoffe	12,87	Proz.
Stickstoff	1,25	Proz.
Unorganische Stoffe	1,20	Proz.

Eine zweite Untersuchung wurde aus dem Schwimmblaseninhalt von zwei Köhlern und vier Schellfischen angestellt.

Auffallend ist vor allem die große Menge von Lipoiden, und zwar lieferte die zweite Untersuchung des Ätherextraktes folgende Zahlen:

Fettmenge	3,55	Proz. der Coccidienmasse.
Unverseifbarer Rückstand:	35,77	Proz. des Fettes
Cholesterin frei:	2,87	" " "
„ zu Estern gebunden:	26,30	" " "
Andere höhere Alkohole:	6,60	" " "
Fettsäuren zu Seifen gebunden:	0,39	Proz. der Coccidienmasse.

Aus diesen Zahlen ist auch ersichtlich, daß ein großer Prozentsatz der Lipoide von Cholesterinestern gebildet wird. Daneben erscheint auch eine kleine Menge von freiem Cholesterin. Das Fett zeichnet sich ferner durch einen besonderen Reichtum an freien Säuren aus. Dieser bildet schon von vornherein einen auffallenden

Unterschied gegenüber dem Körperfett der Fische. PANZER hat jedoch noch weitere Vergleiche angestellt. Er hat zu diesem Zwecke das Fett, welches aus der Leber der Dorscharten gewonnen wird, den Lebertran, ferner das Muskelfett der Schellfische als Vergleichsobjekte herangezogen. Über ersteres liegen genaue Angaben in der Literatur vor, für letzteres wurden zu diesem Zwecke die nötigen Zahlen ausgemittelt.

Daraus ergaben sich folgende Vergleichszahlen:

	Cholesterin- freies Coccidienfett	Muskelfett vom Schellfisch	Lebertran
a) Für das Fett:			
Säurezahl	55,14	70,59	—
Verseifungszahl	223,68	190,13	175—189
Jodzahl	118,3	102,8	139,6—168,4
b) Für die Fettsäuren:			
Molekulargewicht	234,4	—	287,8—292,5
Jodzahl	116,2	—	164,9—170,1

Aus dieser Zusammenstellung ergeben sich wesentliche Abweichungen zwischen der Zusammensetzung der Fettsäuren und Glyceride des Coccidienfettes von der Zusammensetzung des Fettes der Wirtstiere.

Von den weiteren Untersuchungen PANZER's seien noch folgende Angaben hervorgehoben:

Die Sporenkapseln lösen sich in 2 prozentiger Kalilauge bis auf einen geringen, farblosen Rest auf. Dieser Rest besteht durchwegs aus farblosen Körnchen. Die Kapselsubstanz ist in die Gruppe der Albuminoide einzureihen und zwar zu jenen keratin- oder elastinähnlichen Substanzen, welche die Eierschalen mancher höherer Tiere bilden. Auffallend ist das vollständige Fehlen von Schwefel.

Die Sporozoitien enthalten Albumosen. Nucleoproteide, sowie deren Spaltungsprodukte (Nucleinsäuren, Xanthinbasen, reduzierender Zucker und Histone) waren weder in den Sporen, noch überhaupt in dem Untersuchungsmateriale nachzuweisen. Die nachgewiesenen Albumosen scheinen bloß Veränderungsprodukte des Protoplasmas zu sein. Welcher Natur die unveränderten Eiweißstoffe des Protoplasmas sind, ist rätselhaft. Vermutlich kommt koagulierbares Eiweiß kaum in Frage.

In der Masse wurden ferner noch aufgefunden:

1. ein phosphorfrees Glykoproteid,
2. eine leimgebende Substanz.

„Alles in allem zeigt die beschriebene Untersuchung, daß sich der Chemismus dieser einzelligen Organismen in manchen Punkten wesentlich von dem der Zellen höherer Tiere unterscheidet, neuerdings eine Warnung vor dem Bestreben, Beobachtungen, welche an niederen Organismen gemacht worden sind, ohne weiteres auf die Zellen höherer Tiere zu übertragen, gerade jetzt, wo das Experimentieren mit freilebenden Protozoen (Infusorien) eben in Mode ist.“

Die Untersuchungen PANZER's geben ein Gesamtbild von der chemischen Zusammensetzung des Schwimmblaseninhaltes. Eine Sonderung von bestimmten Formelementen zur chemischen Analyse war nur bezüglich der Sporen möglich. Es ist nun klar, daß diese Angaben noch bedeutend an Wert gewinnen, wenn es uns gelingt, die bestimmten, chemisch differenten Bestandteile in den Entwicklungsstadien und den Teilen des Protozoenleibes zu lokalisieren. Es ist schließlich auch zu bedenken, daß außer den Protozoenleibern in verschiedener Menge Kristalle, Tropfen und ungeformte Elemente (Detritus) vorhanden sind. Diese Lokalisierung ist nur auf mikrochemischem Wege möglich. In erster Linie mußte ich mir über die Verteilung des Fettes Klarheit zu verschaffen suchen.

Fett wurde bis jetzt nur selten im Körper von parasitischen Protozoen gefunden. SCHAUDINN beschreibt zwar eine fettige Degeneration der von Coccidien befallenen Darmepithelzellen, stellt jedoch eine Produktion oder überhaupt die Anwesenheit von Fett im Protozoenleib in Abrede.

Eine solche gibt SIEDLECKI für *Caryotropha mesnili* an. Hier entsteht zwischen dem Kern des Parasiten und dem Wirtskern ein dichter Protoplasmastrang, in welchem zuerst die als Reservestoffe aufzufassenden Fettkörnchen entstehen.

THÉLOHAN hat ferner Fett und fettähnliche Substanzen bei *Myxosporidien* beobachtet.

Nach FÜRTH ist nur ein Bruchteil der hohen Fettsäuren in Gestalt von Fetten (Glyceriden) vorhanden; eine weit größere Menge davon findet sich in Form von Kalkseifen vor.

Bezüglich der Coccidien ist eine Notiz MOROFF's bemerkenswert, der bei den Macrogametocyten von *Adelea zonula* die Bildung eigentümlicher, stark glänzender, kugliger Gebilde (Reservestoffe) beschreibt, welche sich mit Osmiumsäure schwarz färben, „was

auf einen fettähnlichen Charakter hindeuten würde; sie sind bis 2μ groß“. Eine weitere Angabe macht MOROFF in seiner großen Aggregataarbeit (p. 9):

„Fettähnliche Plasmaeinschlüsse werden durch die FLEMMING'sche Flüssigkeit stark geschwärzt, infolgedessen wird das Studium der Kernerscheinungen sehr beeinträchtigt. Wenn aber die Schnitte ca. 24 Stunden in Terpentinöl gelassen werden, lösen sich alle diese durch Osmiumsäure geschwärzten Körper vollkommen auf und man bekommt dann äußerst zarte Plasmastrukturen.“ Schließlich hat BORGERT Fetteinschlüsse bei Radiolarien gefunden, dieselben jedoch als Degenerationsprodukte erkannt.

Zur Untersuchung auf Fett eignen sich die gewöhnlichen Schnitt- und Ausstrichpräparate nicht, da sie mit absolutem Alkohol, Äther und Xylol, also mit fettlösenden Reagentien behandelt werden. Das Fett wird dadurch ausgelaugt, und an seiner Stelle erscheinen Vacuolen.

Es wurden daher entweder den frischen Präparaten die passenden Färbemitteln zugesetzt oder bei der Weiterbehandlung der konservierten Ausstriche die obgenannten Reagentien vermieden.

Als Fettfärbemittel eignen sich Osmiumsäure, Sudan III und Scharlach. Vielfach wurden die Kernsubstanzen mit Hämatoxylin oder Safranin gegengefärbt. Bei mit FLEMMING'scher Flüssigkeit fixierten Präparaten bleiben die schwarzen Osmiumniederschläge auch im Xylol erhalten. Man kann daher bei nachfolgender Kernfärbung mit Safranin auch von in Paraffin eingebetteten Schnittpräparaten schöne Bilder von Kernfärbung und Fetteinschlüssen erhalten.

Ich habe bei der morphologischen Beschreibung schon wiederholt auf das Vorhandensein von Fett hingewiesen und will diese Angaben jetzt zusammenfassen. Fett findet sich frei in der Inhaltsmasse in großer Menge in Form von verschiedenenkalibrigen Tropfen. Mitunter überwiegen die Fetttropfen über die Sporen; ferner in Form von Fettsäurenadeln ebenfalls in großer Menge. Ich verweise des weiteren auf die mitunter recht zahlreichen Cholesterintafeln.

Fett findet sich schließlich auch in den Protozoenleibern (Taf. 10 Fig. 27—31). Die Schizonten enthalten Fett in ziemlich großen Tropfen neben den Tochtercaryosomen. Ob jeder Merozoit Fett mitbekommt, konnte ich nicht eruieren. Fett findet sich ferner schon bei relativ jungen Macrogameten in großen Tropfen, so daß ein großer Teil des Protoplasmas mitunter damit angefüllt erscheint (Taf. 10 Fig. 27).

Bei erwachsenen Macrogameten treten die Fetteinschlüsse häufig in den Hintergrund. Nicht selten finden wir Fett in Stäubchenform im ganzen Protoplasma verteilt. Jedes Microtröpfchen ist dann von einem kleinen Hof umgeben. Solche Höfe beobachten wir übrigens auch bei größeren Tropfen. Fetttropfen liegen nicht bloß im Protoplasma, sondern auch in der Kernsafhöhle, hier dicht angeschmiegt an das Caryosom. In letzterem selbst kommen Fetteinschlüsse nicht vor. Auch die Sporoblasten besitzen Fetteinschlüsse. Sehr distinkt treten solche in den Sporozoiten auf, und zwar hier in Vacuolen vor und hinter dem Kern. Es scheint hier zu einem Zusammenfließen der Tröpfchen zu kommen, welche durch das Verschwinden der plastischen Granula begünstigt wird. Häufig konnte ich hier auch Fetttropfen außerhalb der Sporozoiten beobachten, welche so nach nicht in den Teilungsprozeß einbezogen waren. Sie würden dann einem Restkörper gleichzustellen sein.

Die Färbung gelingt bei den Sporozoiten besser, wenn die Sporenkapseln etwas klaffen. Freilich ist dann nicht leicht zu entscheiden, ob nicht Bestandteile den Sporenraum verlassen haben, oder von außen Elemente hineingeraten sind.

Bei der Untersuchung des Nativpräparates mit dem Polarisationmikroskope leuchten bei gekreuzten Nicols bloß die Cholesterintafeln und die Sporenkapseln auf, die lipoiden Einschlüsse und die freien Fetttropfen bleiben dunkel. Bei der großen Menge von Cholesterinestern, welche die chemische Analyse nachgewiesen hat, ist dies immerhin auffallend, da Cholesterinester doppelbrechend auftreten kann.

Bei den spärlichen Angaben in der Literatur, welche über das Vorkommen von Fett in den Leibern parasitischer Protozoen berichten, ist ein so regelmäßiger Befund von relativ großen Mengen eine auffallende Erscheinung. Einen Degenerationsprozeß, an den man sonst in erster Linie denken müßte, können wir bei der Regelmäßigkeit des Auftretens in den verschiedenen Entwicklungsstadien und dem intakten Zustande des Kernes wohl ausschließen. Dagegen spricht auch, daß wir besonders bei jungen Macrogameten bedeutende Fetteinlagerungen finden. Eine Degeneration müssen wir eher bei erwachsenen Individuen erwarten. Wir könnten uns in degenerierten, also pathologischen Formen auch nur schwer eine so bedeutende Fortpflanzungstätigkeit vorstellen.

Wir hätten nun die Fragen zu beantworten: Wo wird das Fett produziert und welche Aufgaben hat es zu erfüllen? Bei der

Beantwortung ergeben sich zum Teil dieselben Schwierigkeiten, wie sie für die Resorption des Fettes im Wirbeltierkörper und für die Frage der Ablagerung in den Zellen bestehen.

Der Körper der Dorsche ist außerordentlich reich an Fett, und die Ablagerung des Fettes ist in manchen Organen, vor allem in der Leber eine so reichliche, daß das Organ zum weitaus größten Teil aus Fett besteht und uns die Funktionsmöglichkeit der Leberzellen unerklärlich erscheint. Schon kurze Zeit nach dem Tode tritt von selbst das Leberfett, bei den Gadiden Lebertran genannt, aus dem Organ als ölige Flüssigkeit heraus. Ich habe sogar ganze Ölcysten in der Leber beobachtet. Auch in den Maschen der Mucosa konnte ich im Zupfpräparate Fetttropfen nachweisen. Es ist demnach nicht zu verwundern, wenn Parasiten, welche auf die Körpersäfte des Wirtstieres angewiesen sind, auch Fett aufnehmen.

Wir müssen dabei aber folgendes bedenken:

Die Coccidien ernähren sich auf dem Wege der Osmose. Dieser Osmose ist aber Fett nicht zugänglich. Daß die Coccidien analog den Amöben Fetttropfen durch Umfließen in ihren Körper aufnehmen, ist nicht anzunehmen. Die chemische Untersuchung hat ferner Unterschiede zwischen der Beschaffenheit des Fettes der Masse und dem Fett des Wirtstieres konstatiert.

Wir könnten uns ja vorstellen, daß das Fett in Form von kleinsten Tröpfchen Eingang findet, im Körper der Coccidien modifiziert wird und zu größeren Tropfen zusammenfließt. Wahrscheinlich wird jedoch das Fett des Wirtsgewebes an der Oberfläche und durch die Einwirkung der Protozoen abgebaut und in diffusible Bestandteile zerlegt, welche im Körper wieder zu Lipiden aufgebaut werden und in Tropfen zusammenfließen. Es wäre dies ein Vorgang des Ab- und Aufbaues, wie ihn ABDERHALDEN auch für die Eiweißkörper im Darm der Säugetiere nachgewiesen hat.

Da wir in der hyalinen Zone der Macrogameten in der Regel keine Fetttropfen finden, ist es naheliegend, diesen Spaltungsprozeß an die äußere Grenzmembran zu verlegen. Schließlich müssen wir auch an die Möglichkeit denken, daß überhaupt nicht das Fett des Wirtskörpers, sondern aufgenommene Eiweißkörper oder Kohlehydrate das Substrat für die Lipide der Protozoen liefern.

Die zweite Frage ist die nach der physiologischen Bedeutung des Fettes. In der mikrochemisch nachzuweisenden Form von Tropfen ist das Fett wohl nur als Reservesubstanz aufzufassen. Als formatives Element könnte es eine Bedeutung für die Lipoid-

membran besitzen, die jetzt allgemein auch dort an der Zelloberfläche als sehr wichtiges Organell angenommen wird, wo wir sie mikroskopisch nicht nachweisen können.

Aber auch andere Elemente könnten davon aufgebaut werden, wie z. B. die plastischen Granula. Dazu ist freilich ein Umwandlungsprozeß nötig durch fermentative Einwirkung der Protozoenzelle. In dieser Hinsicht erscheint mir der Hof um die Fetttropfen, welcher ein Gebilde ähnlich einer Nahrungsvacuole erzeugt, von Bedeutung zu sein. Schließlich könnte das Fett auch als Kraftquelle dienen. Wir brauchen hier nicht an besondere Bewegungen des ganzen Coccidiums, sondern an mechanische Vorgänge im Innern der Zelle denken, z. B. an den Transport der chromatischen Kernelemente bei der Teilung.

Von den übrigen chemisch nachgewiesenen Substanzen ist der Nachweis von keratinähnlichen Stoffen in der Sporenkapsel hervorzuheben. Keratin wird als Bestandteil auch für andere Hüllmembranen der Protozoen angegeben; für Coccidien wurde es bis jetzt chemisch nicht nachgewiesen.

Das Glykoproteid weist als Mukoid auf eine schleimige Substanz hin. Die Konsistenz der Masse würde den Nachweis einer solchen begreiflich machen. Die Vermutung, daß diese Substanz auch in der hyalinen Zone der verschiedenen Entwicklungsstadien sich vorfindet, ist wohl berechtigt.

Das Vorhandensein von tierischem Leim ist deshalb auffallend, weil diese Substanz an kollagene Fasern, also Bindegewebe geknüpft ist, welche bei Protozoen natürlich nicht vorhanden sind.

Bei der Färbung nach MALLORY, welche zum Nachweis der kollagenen Fasern dient, nahmen die Fasernetze, welche die an der Peripherie liegenden Maschen bilden, den blauen Farbstoff intensiv an. Sie entsprechen zweifellos dem ausgedehnten und vielleicht gewucherten Fasernetze der Mucosa. Ob jedoch diese relativ zur Masse ganz minimale Fasermenge genügt, um die Menge des nachgewiesenen Leims zu erklären, weiß ich nicht. Intensiv blau färbt sich im Schnittpräparate nach MALLORY auch die Detritusschichte nach innen von der Mucosa. Möglicherweise besteht sie auch aus leimgebender Substanz.

Zusammenfassende Betrachtungen.

Bei den Fischen sind bis jetzt folgende Coccidienarten beschrieben worden:

Fischart	Organ	Speciesnamen
<i>Mustelus canis</i> MITCHILL	Darm (Spiraldarm)	<i>Goussia lucida</i> LABBÉ
<i>Lamna cornubica</i> GM.	Darm	<i>Pfeifferella gigantea</i> LABBÉ
" " "	"	<i>Coccidium giganteum</i> LABBÉ
<i>Scyllium stellare</i> L.	"	<i>Goussia lucida</i> LABBÉ
<i>Acanthias acanthias</i> L.	"	" " "
<i>Clupea harengus</i> L.	Leber	" <i>clupearum</i> THÉL.
" <i>pilchardus</i> WALL.	"	" " "
" " "	Hoden	<i>Coccidium sardinae</i> THÉL.
<i>Engraulis encrasicolus</i> L.	Leber	<i>Goussia clupearum</i> THÉL.
<i>Gobio gobio</i> L.	Darm	<i>Coccidium metschnikovi</i> LAVERAN
<i>Tinca tinca</i> L.	Niere, Leber, Milz	<i>Goussia minuta</i> THÉL.
<i>Motella tricirrata</i> BL.	Darm, Pylorusanhänge	" <i>motellae</i> LABBÉ
<i>Anmodytes tobianus</i> L.	Darm	" <i>bigemina</i> LABBÉ
<i>Labrus</i> sp.	Leber	" <i>thelohani</i> LABBÉ
<i>Crenilabrus</i> sp.	Darm	" <i>variabilis</i> THÉL.
<i>Lepadogaster gouani</i> LAC.	"	" " "
<i>Gasterosteus aculeatus</i> L.	Leber	<i>Coccidium gasterostei</i> THÉL.
<i>Gobius paganellus</i> L.	Darm	<i>Goussia variabilis</i> THÉL.
<i>Cottus bubalis</i> EUPHR.	"	" " "
<i>Scomber scombrus</i> L.	"	" <i>clupearum</i> THÉL.
<i>Trachurus trachurus</i> L.	Leber	" <i>cruciata</i> THÉL.
<i>Cyprinus carpio</i> L.	Darm	<i>Coccidium wierzejskii</i> HOFER
" " "	"	<i>Eimeria subepithelialis</i> MOROFF et FIEB.

Es beherbergen somit 20 Fischarten 15 Coccidienspecies. Die Liste ist zum allergrößten Teile der Zusammenstellung in LABBÉ Sporozoa entnommen. Sie stammt somit aus einer Zeit, welche vor dem großen Aufschwung in der Coccidienforschung liegt. Meines Wissens ist eine besondere Bereicherung in den Kenntnissen der Fischcoccidien seit dieser Zeit jedoch nicht zu verzeichnen.

Die Beschreibung ist daher fast durchweg lückenhaft. Bei den allermeisten ist bloß das Sporenstadium bekannt. *Pfeifferella gigantea* gehört offenbar, wie schon LABBÉ vermutet, in den Entwicklungscyclus von *Coccidium giganteum* (Schizogonie und Gametenbildung?). Auch bei *E. subepithelialis* war es uns neben der Sporogonie nur

möglich, das Endstadium der Schizogonie zu beobachten. *E. gadi* ist somit das erste Fischcoccidium, an welchem der ganze Entwicklungscyclus studiert werden konnte.

Gemeinsam scheint allen Fischcoccidien zu sein, daß sich die Sporogonie schon im Wirtstier abwickelt, während sie bei den Coccidien der Landtiere in der Regel im Freien abläuft. Für *E. stiedae* haben METZNER und WASIELEWSKY festgestellt, daß die Entwicklung der Sporen durch den Sauerstoff der Atmosphäre begünstigt wird. Da das Wasser nur einige Kubikcentimeter Sauerstoff im Liter absorbiert enthält, also nur einen Bruchteil der Sauerstoffmenge der Luft, so würden solche günstige Bedingungen durch den Austritt der Sporen ins Wasser nicht erreicht werden.

Bei *E. subepithelialis* scheint für ein Sauerstoffbedürfnis die Lokalisation der Sporenbildung in der Submucosa zu sprechen, wo wenigstens Sauerstoff aus den Blutgefäßcapillaren, wie bei der inneren Atmung, diffundiert, während das Darmlumen, wie auch FÜRTH hervorhebt, des Sauerstoffes entbehrt.

Für Fische mit geschlossener Schwimmblase und speziell für Meeresfische wird nun angegeben, daß in der Schwimmblase der Sauerstoff als Inhalt vorherrscht. Das Gas soll zu 69—87 Proz. aus Sauerstoff bestehen. Vielleicht finden wir darin eine Erklärung für die enorme Vermehrung der Schwimmblasencoccidien. In dieser ganz exzeptionellen Nachbarschaft von Sauerstoff und Nährgewebe und der Möglichkeit eines Übertrittes aus dem Wirtsgewebe in ein Sauerstoffreservoir liegt auch möglicherweise die Erklärung für die einzig dastehende Erscheinung, daß diese Coccidien nicht bloß einen ganzen Entwicklungskreis in einem einzigen Organ beenden, sondern gleich einen neuen beginnen.

Die Sporen dienen also nicht allein der propagativen Fortpflanzung im Sinne DOFLEIN's, indem neue Wirtstiere infiziert werden, sondern auch der multiplikativen Fortpflanzung, indem neue Territorien desselben Organs infiziert werden. Biologisch bildet die Form einen ähnlichen Ausnahmefall wie *Taenia murina* der Ratten und Mäuse, welche im Finnenzustande bereits in der Darmwand der genannten Nager lebt und als Finne nach dem Darmlumen durchbricht, um hier zum Bandwurm auszuwachsen.

Diese Wiederaufnahme der Schizogonie kann aber nicht die einzige Aufgabe der Sporen sein. Bei der Ökonomie, welche wir im Aufbau aller Lebewesen finden, hätte der Besitz einer widerstandsfähigen Kapsel keinen Sinn. Außerdem ist dadurch noch nichts für die Erhaltung der Art getan. Es tritt dabei an uns die

Frage heran: Wie kommen die Parasiten in den Wirt und wie gelangen sie wieder heraus, um einen neuen Wirt zu infizieren?

Die Frage ist deshalb nicht leicht zu beantworten, weil die Schwimmblase bei den Gadiden allseitig geschlossen ist und nur die Blutbahn eine Kommunikation mit dem Darm vermittelt.

Die Parasiten wären demnach in ähnlicher Weise festgelegt, wie etwa Finnen und Trichinen. Sie können nur ins Freie bzw. in ein neues Wirtstier gelangen, wenn sie mechanisch aus ihrem Gefängnis befreit werden, sei es daß ihr Wirt oder das entsprechende Organ von einem anderen Tier gefressen, d. h. zerstückelt und chemisch durch die Verdauungssäfte gelöst wird, sei es daß der Wirt zugrunde geht, durch das Wasser maceriert und durch Bakterien und andere Lebewesen zerstört und aufgezehrt wird, wodurch dann die Coccidiensporen ins Freie gelangen. Köhler können trotz ihrer Größe sicher auch anderen Fischen zur Beute fallen. So wurde vor meinen Augen einmal ein gewaltiger Seeteufel an Bord gebracht, aus dessen mächtigem Maule die Schwanzteile von zwei 1 m langen Köhlern herausragten. Noch plausibler ist dies bezüglich der Schellfische.

Wir müßten jedoch weiter annehmen, daß diese Raubfische bloß die Rolle von Befreiern spielen und die Sporen ohne weitere Veränderung den Darm verlassen, so wie dies die Sporen von *E. schubergi* bei Arthropoden tun. Die Annahme eines Zwischenwirtes würde die Frage nicht weniger komplizieren. Es liegen auch diesbezüglich keine Erfahrungen vor.

Am wahrscheinlichsten ist, daß die befallenen Gadiden zugrunde gehen, in der angedeuteten Weise die Bauchwand und Schwimmblasenwand der Zerstörung anheimfallen und die Millionen Sporen in Freiheit gesetzt werden. Den weiteren Verlauf stelle ich mir folgendermaßen vor: Die Sporen werden von Dorschen aufgenommen. Im Verdauungstrakt klaffen die Kapseln, die Sporoziten werden frei, sie durchdringen die Darmwand, gelangen in die Blutbahn und werden in die Gewebe des Körpers geschleudert. Nur in der Schwimmblase finden sie die ihnen zusagenden Existenz- und Entwicklungsbedingungen. In den Bindegewebsmaschen der Mucosa vermehren sie sich zuerst auf agamen Wege, dann durch Sporogonie.

Die Sporoziten infizieren weitere Strecken und beginnen einen neuen Entwicklungszyclus. Die Schwimmblase füllt sich immer mehr mit Sporen und Zerfallsprodukten. Das Gas wird sukzessive verdrängt und ist vollständig geschwunden, wenn die Schwimmblase strotzend mit Parasiten gefüllt ist. Die Funktion der Schwimm-

blase als statisches Organ ist dadurch beeinträchtigt, das Gewicht des Fisches ist um die Masse vermehrt. Zum mindesten wirkt die Parasitenkolonie als Fremdkörper, der auf die Umgebungsdrücke, somit auch auf den roten Körper und die Gefäße drückt. Es ist merkwürdig, daß die Fische den Ausfall eines so wichtigen Organes, wie es die Schwimmblase ist, überleben. In einigen Fällen war das Aussehen der Fische vollständig normal. Daß aber doch Schädigungen eintreten, deuten die von JOH. MÜLLER mitgeteilte Abmagerung, ferner die von mir beobachteten Hautdefekte an.

Die Gadiden sind Grundfische. Bei dem Aufenthalt am Meeresgrunde sind sie wohl befähigt, auch trotz des Ausfalles der Schwimmblase sich zu bewegen und durch Muskelkraft verschiedene kleine Niveaudifferenzen zu überwinden. Zur Laichzeit wandern sie gegen das Ufer und legen ihren Laich ab, der dann auf der Meeresoberfläche schwimmt. Ob nun die Fische ohne funktionierende Schwimmblase dazu befähigt sind, ist sehr fraglich. Vielleicht gehen sie gerade um diese Zeit zugrunde.

Nur ganz nebenbei möchte ich noch eine Möglichkeit streifen. Da Entwicklungsformen sicher ins Blut gelangen, wie wir dies schon oben vorausgesetzt haben, so wäre es nicht ganz undenkbar, daß von blutsaugenden Parasiten — ich denke hier an Copepoden, z. B. Caligusarten — auch solche kleine Entwicklungsformen (Sporoziten oder Merozoiten) von denselben aufgenommen und bei Wechsel des Wirtes auch auf ein anderes Tier überimpft werden, analog den Trypanosomen. Von Myxosporidien habe ich übrigens selbst Sporen im Blute von Karpfen gefunden. Daß sich Entwicklungsformen unserer Art zeitweilig im Blute vorfinden, ist nahezu sicher, da wir uns sonst die Einwanderung in die Schwimmblase kaum erklären könnten. Ein solches Vorkommen im Blut ist auch für manche Coccidien (*Isospora lieberkühni*) nachgewiesen und wird für andere vermutet. DOFLEIN hält auch ein Vorkommen in den Blutzellen für plausibel.

Ich bin mir bewußt, daß alle diese Annahmen stark hypothetischer Natur sind, habe sie aber doch angeführt, um Angriffspunkte für weitere Untersuchungen zu liefern.

Der Umstand, daß die Coccidien in so großer Menge in der Schwimmblase wuchern, daß sie ferner allen anderen Organen (Darm, Leber, Milz, Niere) fehlen, läßt schließen, daß ihre Organisation auf die hier herrschenden, einzigartigen Verhältnisse abgestimmt ist. Sie bieten daher ein Beispiel eines hoch angepaßten Organparasitismus. Die nötigen Anpassungseinrichtungen können aber

nicht immer wieder erworben werden; sie müssen ererbt sein. Wir können daher nicht zweifeln, daß solche Schwimmblasencoccidien wieder von Schwimmblasencoccidien abstammen. Damit erledigt sich auch der vielleicht erhobene Einwurf, daß der Aufenthalt in der Schwimmblase der Gadiden überhaupt nur ein fakultativer ist, daß es sich somit um verirrte Parasiten handle.

Dagegen würde freilich auch die große Häufigkeit des Auftretens sprechen. Wir müssen demnach in der Hauptsache die beobachteten Erscheinungen als normale, zum Lebenskreis des Parasiten gehörige betrachten.

Eine weitere Eigentümlichkeit unserer Parasiten bietet das Verhalten zum Wirtsgewebe. Entsprechend dem übereinstimmenden Vorkommen der drei gut erforschten Coccidienarten sind wir gewohnt, die Coccidien als Schmarotzer des Darmepithel und der Zellen der Anhangsdrüsen zu betrachten. Der Darm ist ja auch die normale Eingangspforte. Diese Anschauung stimmt auch für die weitaus meisten Coccidien. Sie scheint auch zum Teil für die Fischcoccidien zuzutreffen. Auch für *E. subepithelialis* haben wir festgestellt, daß die Jugendstadien im Darmepithel schmarotzen, während die Sporulation allerdings im submukösen Bindegewebe vor sich geht. Es gibt aber noch andere Ausnahmen. SCHAUDINN hat bei *Cyclospora caryolytica* auch das Eindringen in die Kerne von Bindegewebszellen beobachtet. Gelegentlich geht auch die Sporulation von *E. schubergi* und *E. stiedae* in der Darmwand vor sich. *E. truncata* schmarotzt in den Harnkanälchen der Niere von Hausgänsen, *E. mitraria* entwickelt sich hauptsächlich extrazellulär im Darm-lumen von *Damonia reevesi* (zit. nach DOFLEIN), bei *Isospora lieberkühni* dringen die Sporozoiten aus den Darmepithelzellen in die Blutbahn ein, erzeugen eine Allgemeininfektion und sind in den Endothelzellen der Blutgefäßkapillaren von Lunge, Leber, Dickdarm, Fettkörper und Niere zu finden. *Caryotropha mesnili* schmarotzt in der Leibeshöhle des Polychäten *Polymnia nebulosa*, *Klossiella muris* in den Nierenglomerulis der Hausmaus, *Adelea mesnili* in den Fettkörperzellen der Motte *Tineola biseliella*, *Adelea zonula* MOROFF im Fettkörper der Larven von *Blaps mortisaga*, *Legerella nova* in den MALPIGHI'schen Gefäßen von Tausendfüßern, *Klossia helicina* in der Niere von Schnecken, *Orcheobius herpobdellae* im Hoden von *Herpobdella atomaria*. Von den angeführten Fischcoccidien sei das Vorkommen von *Coccidium sardinae* im Hoden von *Clupea pilchardus* erwähnt.

Ganz eigenartig liegen die Verhältnisse in unserem Falle. Obwohl auch in der Schwimmblase Epithelzellen und zwar in drüsiger

Anordnung als Bekleidung der Zotten des roten Körpers vorkommen, sah ich doch in einer infizierten Schwimmblase diese Zellen frei von Coccidien. Aber auch die Bindegewebszellen sind in der Regel frei von diesen Parasiten, abgesehen von jenen zweifelhaften Fällen, wo ich die Konturen einer Bindegewebszelle um die Parasiten zu sehen glaubte. Die Merozoiten dringen sicher in der Regel nicht in Zellen ein. Sie verstreuen sich vielmehr in den Maschen des Bindegewebes, und entwickeln sich daselbst zu den Schizonten und den übrigen Stadien. Sie leben also nicht auf Kosten des Zellprotoplasmas von Wirtszellen, sondern nähren sich von dem in den Maschen vorhandenen Gewebsaft. Diese extrazelluläre Lebensweise beherrscht auch die übrigen Entwicklungsstadien.

Kurz zusammengefaßt sind die Hauptpunkte unserer Untersuchungsergebnisse folgende:

1. Die beschriebenen Coccidien machen ihre vollständige Entwicklung in demselben Organ desselben Wirtstieres durch.

2. Die Sporozoiten können sich in demselben Organ aufs neue ungeschlechtlich fortpflanzen.

3. Die Sporozoiten besitzen ein Caryosom.

4. Die Microgameten sind geißellos. Sie ähneln den Microgameten der Plasmodien.

5. Die Coccidien dringen der Hauptsache nach nicht in Zellen ein, sie sind zeitlebens extracellulär.

6. Ein wesentlicher Bestandteil ihres Körpers ist Fett, welches von dem des Wirtskörpers verschieden ist.

Literaturverzeichnis.

- 1) JOH. MÜLLER u. A. RETZIUS: Über parasitische Bildungen. MÜLLER's Archiv Jahrg. 1842 p. 193—198.
- 2) BRONN: Klassen und Ordnungen. Bd. 1, BÜTSCHLI, Protozoa.
- 3) LEUCKART: Die Parasiten des Menschen. II. Aufl., Bd. 1.
- 4) SCHAUDINN: Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool Jahrb., Abt. Anat., Bd. 13, 1900.
- 5) —: Studien über krankheitserregende Protozoen. *Cyclospora caryolytica*. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Vol. 18, 1901.
- 6) LÜHE: Ergebnisse der neueren Sporozoenforschung. Centralbl. f. Bakteriol. Bd. 27 p. 368, 1900.
- 7) LABBÉ: Sporozoa.
- 8) METZNER: Untersuchungen über *Coccidium cuniculi*. Arch. f. Protistenk. Bd. 2 1903.

- 9) WASIELEWSKY: Studien und Mikrophotogramme zur Kenntnis der pathogenen Protozoen. Heft 1 1904.
- 10) MOROFF u. FIEBIGER: Über *Eimeria subepithelialis* n. sp. Arch. f. Protistenk. Bd. 6 1905.
- 11) MOROFF: Untersuchungen über Coccidien. I. *Adelea zonula* n. sp. Arch. f. Protistenk. Bd. 8,
- 12) OPPEL: Lehrb. d. vergl. mikroskop. Anat. d. Wirbeltiere Bd. 6. Jena 1905.
- 13) HOFER: Handbuch der Fischkrankheiten.
- 14) MOROFF: Die bei den Cephalopoden vorkommenden Aggregataarten usw. Arch. f. Protistenk. Bd. 11 1908.
- 15) FIEBIGER: Über Coccidien der Schwimmblase der Gadusarten. (Vorläufige Mitt.) Annalen d. k. k. naturhist. Hofmuseums 1907.
- 16) —: Über Coccidien in der Schwimmblase der Dorsche. Sitzungsprotokoll Wiener klin. Wochenschr. 1912 Nr. 8.
- 17) —: Die tierischen Parasiten der Haus- und Nutztiere. Wien 1912.
- 18) JOLLOS: Multiple Teilung und Reduktion bei *Adelea ovata*. Arch. f. Protistenk. Bd. 15 1909.
- 19) PROWAZEK: Einführung in die Physiologie der Einzelligen (Protozoen). Leipzig 1910.
- 20) AUERBACH: Bemerkungen über Myxosporidien. Zool. Anz. Bd. 34 Nr. 3/4 p. 81 1909.
- 21) HARTMANN: Die Konstitution der Protistenkerne. Jena 1911.
- 22) PANZER: Beitrag zur Biochemie der Protozoen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73 H. 1/2.
- 23) DOFLEIN: Lehrbuch der Protozoenkunde. III. Aufl.
- 24) REICH: Das Kaninchencoccid *Eimeria stiedae* usw. Arch. f. Protistenk. Bd. 28 Heft 1.
- 25) HARTMANN u. KISSKALT: Praktikum.
- 26) FÜRTH: Chemische Physiologie der niederen Tiere.
- 27) BORBERT: Über Erscheinungen fettiger Degeneration bei triplyleen Radiolarien. Arch. f. Protistenk. Bd. 16.
- 28) GÜNTHER: Handbuch der Ichthyologie.
- 29) BRAUN: Die tierischen Parasiten des Menschen. IV. Aufl.

Tafelerklärung.

Tafel 10.

Die Abbildungen wurden mit Ausnahme von Fig. 1 mit dem Zeichenapparate bei $\frac{1}{12}$ Immersion und Kompens. Okular 12 in Objektischhöhe gezeichnet und auf $\frac{3}{4}$ verkleinert.

Fig. 1. Durchschnitt durch die Wand einer infizierten Schwimmblase. a) Fibrosa, b) glatte Muskelfasern, c) Gefäßschichte, d) Mucosa mit Jugendstadien, e) Tetrasporen in den Maschen der Mucosa, f) Sporen mit Detritus.

Fig. 2. Jugendlicher Schizont mit zwei Tochterkernen. Länge 9,6 μ .

Fig. 3. Schizont mit vier Tochterkernen. Länge 11,2 μ .

Fig. 4. Vielkerniger Schizont. 22,5 : 14,5 μ .

- Fig. 5. Auflockerung der Tochtercaryosome.
Fig. 6. Merozoitenbildung, zwei Rosetten. $53:20\ \mu$.
Fig. 7. Anschnitt durch einen Schizonten, die Merozoiten in Ablösung begriffen, anscheinend kugelig.
Fig. 8. Sporozoit, am Beginn einer neuerlichen Schizogonie. Teilung des Caryosoms. Centrodeseose.
Fig. 9. Schizont, aus einem Sporozoiten hervorgegangen, mit zwei Kernen.
Fig. 10. Langgestreckter Sporozoit mit vielen, hintereinander liegenden Kernen, anscheinend in Degeneration begriffen.
Fig. 11. Junger Microgametocyt(?).
Fig. 12. Microgametocyt mit multiplen kleinen Kernen an der Oberfläche.
Fig. 13. Streckung der Tochterkerne.
Fig. 14. Reifer Microgametocyt mit hyaliner Zone. $22,5:16\ \mu$.
Fig. 15. Reifer Microgametocyt mit gestäubten Microgameten.
Fig. 16. Macrogamet in sternförmiger Bindegewebszelle(?).
Fig. 17. Macrogamet.
Fig. 18. Macrogamet mit Centriol.
Fig. 19—23. Macrogameten mit Reifungserscheinungen.
Fig. 24. Sporoblastenbildung.
Fig. 25. Tetrasporen mit ausgeschlüpften Sporozoiten. Durchmesser $28\ \mu$.
Fig. 26 a u. b. Sporen mit Sporozoiten.
Fig. 27—31. Fettfärbungen.
Fig. 27—29. Ausstriche in Sublimat-Alkohol-Eisessig fixiert, gefärbt mit Hämalaun und Sudan III.
Fig. 30, 31. Fixation in FLEMMING'schem Gemisch, Safraninfärbung (Fett im Präparat schwarz, Chromatin rot).
Fig. 27. Junger Macrogamet.
Fig. 28. Erwachsener Macrogamet mit zitzenförmigem Fortsatz (Empfängnis-hügel?).
Fig. 29. Macrogamet mit Centriol(?) im Caryosom. Höfe um die Fettkugeln.
Fig. 30. Sporoblasten mit Restkörper. Caryosom als sehr kleines Korn zu sehen.
Fig. 31. Spore mit einem Sporozoiten (der andere nicht sichtbar).

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Recherches sur les *Rhytidocystis* parasites des Ophélies.

Par

P. de Beauchamp,

préparateur à la Faculté des Sciences de Paris.

(Avec les planches 11 et 12 et 9 figures dans le texte.)

Sommaire.

	pages
Introduction	139
<i>Rhytidocystis henneguyi</i> DE BEAUCHAMP parasite d' <i>Ophelia neglecta</i> A. SCHNEIDER	140
1° Quelques remarques anatomiques et systématiques sur l'hôte	140
2° Les stades intra-épithéliaux et sous-épithéliaux	145
3° La réaction de l'organisme parasité	147
4° La fin de la période de croissance et la répartition dans l'hôte	150
5° La sporulation	152
6° Les formes intra-intestinales, leur signification	158
<i>Rhytidocystis opheliae</i> HENNEGUY parasite d' <i>Ophelia bicornis</i> SAVIGNY	160
Discussion et conclusion	162
Index bibliographique	166
Explication des planches	167

Introduction.

Le genre *Rhytidocystis* a été créé par HENNEGUY¹⁾ en 1908 pour une forme, qu'il range dans les Grégarines Monocystidées, parasite du cœlome d'*Ophelia bicornis* SAVIGNY au Croisic; d'après sa courte description qui indique les points essentiels du cycle évolutif: présence de jeunes stades dans l'épithélium, enkystement toujours solitaire, stade de perlage aboutissant à des spores n'ayant que deux sporozoïtes, on pouvait juger qu'il s'agissait d'un type très aberrant utile à étudier en détail. Malheureusement l'auteur dut s'arrêter là faute de matériel. J'ai fait connaître en 1912 une seconde espèce, *Rh. henneguyi*, trouvée dans *O. neglecta* A. SCHNEIDER à Roscoff, et différente par la forme du trophozoïte adulte et la localisation dans l'hôte; c'est l'étude détaillée que j'ai pu faire de son cycle évolutif au point de vue cytologique qui sera le sujet du travail actuel. J'avais maintenu dans le titre de ma note préliminaire le qualificatif de Grégarine, conformément à HENNEGUY; je ne l'ai pas gardé dans celui du présent mémoire car il m'a paru que, dans l'impossibilité où je me suis trouvé de localiser un phénomène sexuel, la position systématique méritait tout au moins une discussion sérieuse; on la trouvera dans le dernier chapitre.

M^r le professeur HENNEGUY a bien voulu me communiquer ses préparations originales de *Rh. opheliae* et me permettre d'en redonner, par comparaison avec les stades décrits par moi, des descriptions et des figures qui font de ce travail la monographie du genre entier. Je lui en exprime ici tous mes remerciements; j'en dois aussi à M^r le professeur DUBOSCQ et à mon ami E. CHATTON, dont la compétence protistologique m'a été d'un grand secours.

La technique n'a rien présenté de particulier: fixation au Bouin alcoolique ou au sublimé-alcool additionné d'un peu d'acide nitrique, coloration à l'hémateïne ou à l'hématoxyline de HEIDENHAIN suivies d'orange G ainsi que par la méthode de MANN.

¹⁾ En réalité, bien probablement, le premier qui ait rencontré une espèce de ce genre est GIARD qui dès 1886 signale un „*Lithocystis opheliae*“ dans *O. bicornis* du Poulignen. Comme le dit DE ST. JOSEPH, il est vraisemblable que cette Annélide était en réalité *O. neglecta* décrite plus tard par SCHNEIDER au même endroit, et le parasite est sans doute identique au mien. Mais le nom de GIARD n'étant accompagné d'aucune description n'établit pas une priorité.

Rhytidocystis hennequyi DE BEAUCHAMP parasite
d'*Ophelia neglecta* SCHNEIDER.

1° Quelques remarques anatomiques et systématiques
sur l'hôte.

Il est d'abord nécessaire de préciser le nom et les affinités de l'Ophélie de Roscoff où j'ai rencontré le parasite et de donner quelques détails sur la topographie de l'intestin et du chloragène sans lesquels ses migrations et les troubles qu'il suscite seraient incompréhensibles. Les données de SCHAEPPI (1893) sur *O. radiata* (DELLE CHIAJE) et celle de DE ST. JOSEPH (1898) sur l'espèce qui nous occupe ne sont en effet pas suffisantes à notre point de vue.

Ophelia neglecta a été décrite par A. SCHNEIDER en 1892 sur des exemplaires provenant du Pouliguen (Loire-Inférieure); cet auteur, trouvant des contradictions dans la littérature antérieure, soupçonne que son espèce est celle que PRUVOT avait rencontrée à Roscoff (Finistère) et déterminée *O. bicornis* SAVIGNY dans son travail sur le système nerveux des Polychètes. Je regarde cette opinion comme très probable car je n'ai jamais trouvé à Roscoff *O. bicornis* et j'y ai rencontré *O. neglecta* précisément aux points indiqués par PRUVOT dans son mémoire de 1897 (banc de sable du Loup à Perharidi et grand banc de l'île de Bas). Elle y est d'ailleurs très rare et je n'ai pas eu l'occasion de vérifier si elle y était parasitée; tous les individus que j'ai étudiés provenaient de la plage sableuse qui remplit l'anse de Terrénès, à l'embouchure de la rivière de Morlaix, où l'espèce est très abondante à un niveau assez bas de la zone des marées et parasitée de façon presque constante. Dans tous les points cités elle est associée, comme au Pouliguen, à un autre Ophéliidé, *Travisia forbesi* JOHNSTON, qui ne m'a offert rien d'analogue aux *Rhytidocystis*¹⁾. La seule mention que nous en eussions sur la côte N. de Bretagne était due à FAUVEL, qui en a remis à DE ST. JOSEPH un échantillon recueilli dans la baie de Lannion (Côtes-du-Nord).

¹⁾ J'aurai l'occasion prochainement d'insister dans une étude d'ensemble de la faune intercotidale dans la région de Roscoff sur l'association caractéristique des plages de ce type et leur répartition. En dehors de l'*O. neglecta* on a signalé à Roscoff *O. radiata* (DELLE CHIAJE) vivant dans le maerl à *Lithothamnion calcareum* un peu en dessous de la zone des marées (PRUVOT 1897), et *O. limacina* RATHKE var. *roscoffensis* AUGENER décrite par cet auteur (1910) d'après un échantillon ancien, sans provenance indiquée, de la collection du Laboratoire. Je ne les ai moi-même rencontrées ni l'une ni l'autre.

Pour en revenir à la systématique, *O. neglecta* et *O. bicornis* ont été redécrites comparativement avec grand soin par DE ST. JOSEPH sur des échantillons provenant les uns de la station initiale, le Pouliguen, les seconds du Croisic (d'ailleurs peu éloigné) et fournis par HENNEGUY lui-même. Il n'y a donc pas de doute sur la détermination et l'individualité des hôtes des deux parasites, il est vrai très voisins. Le caractère principal se trouve dans le nombre des branchies (15 paires dans *O. bicornis*, 18 dans *O. neglecta*, qui a également des papilles anales plus nombreuses); il peut paraître mince, mais je puis affirmer sa constance dans tous mes échantillons.

Conformément aux données des auteurs antérieurs, le tube digestif d'une *Ophelia* comprend un pharynx, que nous laisserons complètement de côté, un œsophage court, un estomac ovoïde et un intestin qui remplit la plus grande partie de la longueur. Considérons d'abord une coupe transversale au milieu de celui-ci (fig. A dans le texte). Bien que le contour extérieur soit à peu près circulaire, la lumière a la forme d'un fer à cheval à concavité ventrale: il existe en effet dans toute la longueur de l'intestin une invagination d'une des parois tout à fait analogue au typhlosolis de certaines autres Annélides avec cette différence qu'elle est ventrale et non dorsale comme chez les Oligochètes par exemple; nous la désignerons d'ailleurs pour la commodité du discours sous ce nom qui ne préjuge pas de sa situation. La forme de la lumière est encore compliquée secondairement par des plissements qui intéressent l'endoderme seul. La disposition est identique à celle décrite par BRASIL (1905) dans l'intestin de la Pectinaire (*Lagis koreni* MALMGR.) et comme chez celle-ci l'un des culs de sac qui terminent la lumière aux deux bouts du fer à cheval est spécialement différencié au point de vue des formations vibratiles et forme gouttière ciliée d'un bout à l'autre de l'organe. Cette gouttière marque la véritable génératrice médiane de l'intestin, comme le montrent ses rapports étroits avec le vaisseau ventral. L'invagination typhlosolienne est donc juxta-médiane et asymétrique.

La paroi externe¹⁾ de l'intestin nous montre la succession classique des couches qui constituent le tube digestif d'une Annélide: de dedans en dehors l'épithélium endodermique — le sinus sanguin (il n'existe pas de vaisseau dorsal distinct de lui chez les Ophélies) —

¹⁾ J'emploierai les mots externe et interne par rapport non au centre morphologique de la lumière, mais au centre géométrique de l'ensemble qui se trouve bien entendu au milieu du typhlosolis, j'appellerai aussi paroi réfléchie celle qui forme ce dernier organe.

la basale du péritoine — enfin ce feuillet lui même différencié en tissu chloragogène. L'épithélium est formé de cellules hautes très minces et très serrées, de sorte qu'il est difficile de les individualiser sur les coupes et que leurs noyaux se disposent sur plusieurs rangs; elles présentent une bordure en brosse, des cils distincts de celle-ci et un cône de racines ciliaires, cils et racines d'ailleurs difficiles à bien fixer (sauf dans la gouttière ventrale où ils sont plus développés, les cellules plus larges, les noyaux plus gros et sur un seul rang). Entre leurs pieds on distingue des cellules n'arrivant pas à la surface, à protoplasma plus spongieux qui paraissent soit ovoïdes ou irrégulières, soit recourbées en berceau (fig. B dans le texte). Ce ne sont point des éléments de remplacement, car la multiplication s'effectue par des mitoses superficielles tout à fait comparables à celles qu'a vues BRASIL dans les cellules analogues de *Lagis*. A la base de l'épithélium existe (contrairement à la description de SCHAEPPI pour *O. radiata*) une première couche musculaire (*mse*) interne par rapport au sinus sanguin; elle se compose de fibres minces, assez irrégulières, de direction longitudinale principalement; mais en certains points on distingue une seconde couche circulaire en dehors de celle-ci. Comme c'est le cas ordinaire chez les Annélides, il n'existe pas de basale bien nette; pourtant l'épithélium est limité du côté du sinus par une couche très mince, irrégulière et feutrée, intimement unie à la musculature, qui prend électivement le lichtgrün et le bleu de méthyle (pl. 12 fig. 19) et qu'il faut envisager soit comme une basale rudimentaire formée par l'endoderme, soit comme un feuillet conjonctif de provenance mésenchymateuse. Son origine, quelle- qu'elle soit, est sans doute celle de la musculature.

Au contraire de l'autre côté du sinus sanguin nous trouvons une membrane anhiste épaisse et continue (*bp*), prenant avec intensité les colorants ci-dessus, qui est la basale du péritoine. Celui-ci est différencié en chloragogène (*chp*) tout autour de l'intestin sauf sur la ligne médiane dorsale, où la basale épaissie n'est recouverte que d'un épithélium très aplati. Les cellules sont hautes, toutes semblables et également remplies d'inclusions et ne forment pas à la périphérie des papilles de structure différente comme les décrit SCHAEPPI. Juste en dehors de la basale se trouve une couche de fibres circulaires puissantes (*msp*), qui sont la musculature née de la splanchnopleure, beaucoup plus constante que l'autre chez les Annélides et destinée à la progression du sang dans le sinus, celle là l'étant à celle du sable dans l'intestin.

Entre péritoine et endoderme existe le sinus périintestinal (*si*)

qui représente l'espace blastocœlien. Tandis que chez *O. radiata* (et chez *O. bicornis* d'après les préparations de M^r HENNEGUY) il est très spacieux et baigne de toutes parts le manchon épithélial, ici

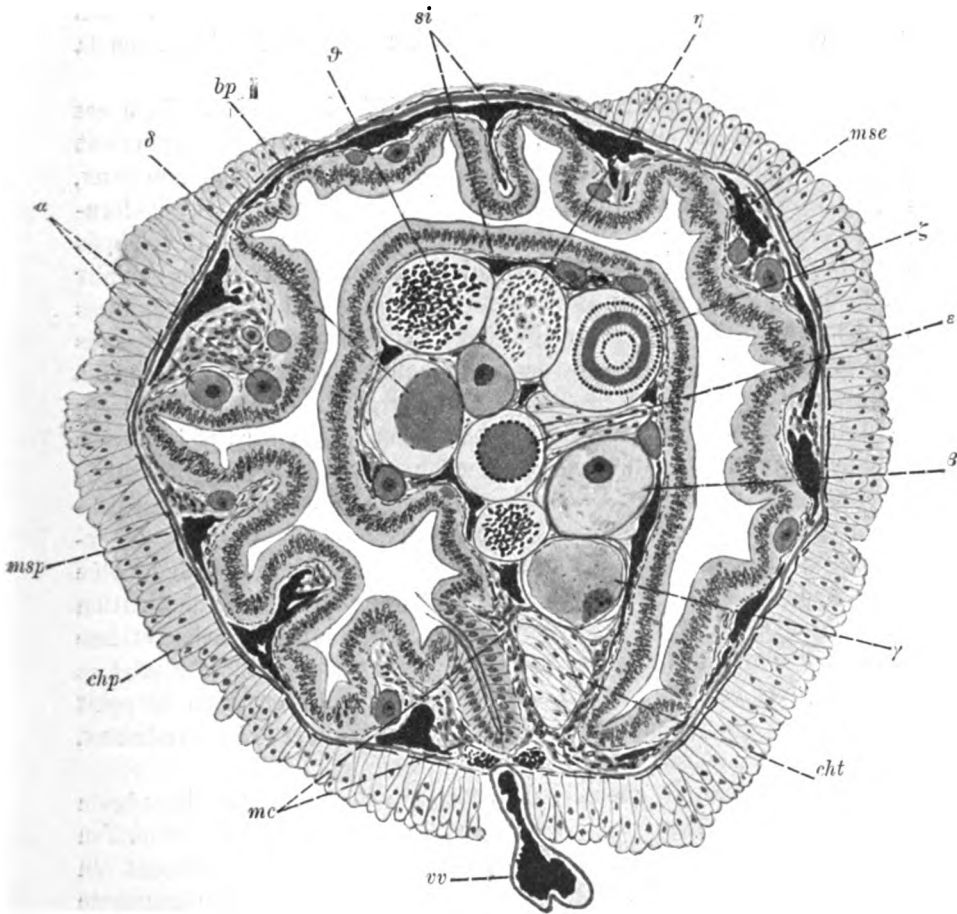


Fig. A. Coupe transversale (demi-schématique) $\times 100$ de l'intestin d'*Ophelia neglecta*, montrant les différents stades de l'évolution de *Rhytidocystis henneguyi*: α , jeunes formes sous-épithéliales; β , trophozoïte adulte; γ , stade à noyau périphérique; δ , stade de multiplication des noyaux; ϵ , stade de perlage; ζ , formation des sporoblastes; r , sporoblastes détachés et résidu; ϑ , spores mûres.

Pour les autres lettres voir p. 167.

nous le trouvons réduit à un système de lacunes irrégulières par le fait que les deux feuilletts se touchent presque au fond des cryptes et que l'espace restant est en partie obstrué par des amas de leucocytes polyédriques (*lc*) à gros noyau réticulé qui par endroits

s'entassent et se stratifient en un véritable tissu conjonctif (*mc*). Ce sont très probablement les dérivés du mésenchyme primitif. Nous verrons leur rôle important dans la lutte contre le parasite. Les plaques de plasma coagulé sans cellules qui remplissent les lacunes prennent avec intensité l'hématoxyline au fer, et l'éosine dans la méthode de MANN.

Du côté du typhlosolis le feuillet réfléchi de l'épithélium est tout à fait semblable à l'autre. Toute la cavité du repli appartient originairement au sinus sanguin et à ses éléments mésenchymateux, le péritoine se fermant sur lui-même à son hile, mais le tissu chloragogène a poussé à son intérieur des bourgeons qui, peu développés chez *O. radiata* et *O. bicornis*, ont fini chez *O. neglecta* par le remplir en grande partie, ne laissant à côté d'eux que des lacunes sanguines et des amas conjonctifs irréguliers. Ils forment des lobes sans disposition épithéliale nette dont les cellules, comme l'a remarqué SCHAEPLI, ne sont pas tout à fait semblables (*cht*) à celles du péritoine externe: les inclusions sont moins abondantes et localisées autour du noyau (fig. 3, pl. 11). Comme nous l'avons dit la basale se continue avec elle-même en rejoignant la paroi du vaisseau ventral qui lui est identique par son origine, en avant du hile du typhlosolis; mais elle est à ce niveau amincie et irrégulière, dédoublée et sans doute fenestrée de façon à permettre non une communication ouverte entre le blastocœle et le cœlome mais une filtration et une diapédèse dont nous verrons les conséquences plus loin. De part et d'autre de la gouttière ciliée endodermique qui aboutit en ce point se trouvent deux puissants faisceaux musculaires longitudinaux, d'origine sans doute péritonéale.

La topographie que nous venons de décrire dans la région moyenne de l'intestin varie peu dans sa portion inférieure où l'on constate simplement l'ouverture du repli et le déplissement du manchon endodermique. En haut au contraire le diamètre augmente et le plissement se complique; en même temps apparaissent dans l'épithélium des éléments glandulaires allongés, remplis de petites boules sidérophiles, tout à fait semblables aux glandes claviformes de la première partie de l'intestin chez la Pectinaire. On arrive ainsi graduellement à l'estomac complètement obstrué par des plis se ramifiant dans tous les sens et partant d'après DE ST. JOSEPH de trois points d'attache principaux. L'épithélium est criblé de glandes claviformes et le sinus sanguin, à peu près virtuel, renferme encore quelques petits lobules de chloragogène. Dans l'œsophage l'épithélium garde ses caractères, mais la lumière s'accroît, car il ne renferme

plus qu'une petite invagination ventrale plissée. L'épaisseur et le degré de plissement de l'épithélium, les proportions du mésenchyme et du chloragogène dans le typhlosolis, paraissent varier non seulement d'un bout du tube digestif à l'autre mais d'un individu à l'autre, suivant l'âge, peut-être aussi suivant le degré d'infection.

2° Les stades intra-épithéliaux et sous-épithéliaux.

Les plus jeunes stades de *Rhytidocystis* que j'aie observés se trouvaient déjà entre la base des cellules de l'épithélium intestinal, dans la position et avec la forme qu'ils gardent pendant la première partie de leur croissance. J'ai pris quelque temps pour des sporozoïtes en voie de migration des corpuscules ovoïdes, renfermant un gros point chromatique et un ou deux autres plus petits dans un plasma homogène, que je rencontrais dans la partie distale de l'épithélium; un examen attentif m'a convaincu qu'il s'agissait de noyaux du même épithélium émigrés à ce niveau pour s'y diviser comme nous l'avons vu et traversant un stade de synapsis; ils étaient d'ailleurs notablement plus petits que les sporozoïtes contenus dans la spore. Cette absence des tout premiers stades n'a rien qui doive surprendre étant donné que les Ophélies au moment de la récolte ont l'intestin rempli de sable qui empêche non seulement les coupes mais un examen un peu approfondi sur le vivant et qu'il faut attendre pour qu'elles s'en débarrassent trois ou quatre jours, pendant lesquels les sporozoïtes récemment avalés ont le temps de traverser l'endoderme; nous verrons dans le chapitre suivant qu'on trouve du moins des réactions locales développées autour d'eux.

Les stades jeunes comme celui de la pl. 11 fig. 1 (j'en ai observé de moitié plus petits environ) sont ovoïdes, souvent un peu aplatis sur une face; ils peuvent croître dans l'épithélium ou le sinus jusqu'à un diamètre maximum de 80 μ et sont alors régulièrement arrondis, sauf compression (ou rétraction par le fixateur). Le protoplasma d'abord homogène et basophile laisse alors reconnaître une structure qui ne s'écarte point de ce qui est connu dans la plupart des Grégarines et Coccidies: il est formé d'alvéoles sphériques régulières incluses dans un réseau un peu plus foncé dont les mailles renferment de très petits grains assez réfringents, prenant la laque ferrique et l'éosine. Je n'ai jamais observé aucune formation au centre de ces sphérules, qui diminuent de taille à la périphérie. Le noyau, proportionnellement très grand dans les stades jeunes, croît moins vite; il est plus ou moins arrondi et montre un nucléole volumineux et

sphérique. La méthode de MANN colore celui-ci en rouge, le suc nucléaire tantôt uniformément en bleu intense (pl. 12 fig. 19) tantôt (et dans la même préparation) en lilas granuleux sur lequel se détachent quelques grains d'un bleu franc, en couronne (fig. 20). Ce sont surtout les rapports du parasite avec les tissus qui sont intéressants à ce stade; faisant abstraction de ce qui constitue un processus de défense et sera étudié au chapitre suivant, nous constatons qu'une fois arrivé au milieu des cellules de l'épithélium près de la musculature basale il refoule les premières et les aplatit autour de lui pour s'en former un kyste, exerce en même temps sur elles une action atrophique qui se traduit par une dépression de leur surface, puis écarte les fibres de la seconde et passe à travers pour tomber dans le sinus sanguin. En effet dès le début on voit les cellules se serrer et s'incliner autour du jeune Sporozoaire (pl. 11 fig. 1 *ec*), souvent même s'enrouler en écaille d'oignon et produire un véritable englobement épithélial presque comparable à celui que figure BRASIL (1905, p. 234). Au stade suivant elles se sont fusionnées en une couche de protoplasma stratifié, puis homogène, où les noyaux sont parfaitement reconnaissables (pl. 11 fig. 2 et pl. 12 fig. 19). Il se peut que des cellules migratrices participent à la formation de cette écorce; je suis pourtant convaincu que le rôle principal revient aux cellules épithéliales; d'abord j'ai observé les stades intermédiaires entre les fig. 1 et 2 de la pl. 11; ensuite les noyaux existent du côté basal mais sont beaucoup plus nombreux du côté distal, au niveau de la rangée qu'ils forment dans les autres cellules inclinées sur le kyste (pl. 12 fig. 19).

Dans quelques cas le parasite reste inclus dans l'épithélium en refoulant peu ou pas la musculature et la pseudo-basale; alors la hauteur de celui-ci reste uniforme, mais elle finit par être occupée toute entière par le trophozoïte qui n'est plus séparé de la lumière que par une mince couche protoplasmique avec quelques noyaux. Les cellules sont un peu écartées et aplaties, mais surtout atrophiées en quelque sorte et digérées, de sorte que la cavité paraît parfois forée à l'emporte-pièce. Les parasites ayant évolué de cette façon sont perdus: ils ne peuvent sporuler dans cette position et finissent souvent par rompre l'enveloppe trop mince et tomber dans la cavité intestinale où nous les retrouverons (chap. 6); le frottement du sable qui remplit celle-ci facilite évidemment le phénomène. Mais le plus souvent il n'en est pas ainsi: le sporozoïte s'enfonce dans la profondeur en écartant les fibres musculaires (pl. 11 fig. 2), et comme l'atrophie de l'épithélium s'est produite en même temps (ce

qui prouve bien qu'elle n'est pas seulement mécanique), celui-ci l'accompagne et se déprime en une crypte dont la profondeur égale sa hauteur primitive; le fond n'en est à la fin plus formé que par une ou deux cellules aplaties montrant encore des noyaux peu altérés. L'écorce cellulaire suit l'animal dans sa progression en s'amincissant à mesure qu'il grossit; les fibres musculaires déplacées par lui le brident et creusent souvent à sa surface des sillons plus ou moins profonds. Il devrait alors se trouver libre dans le sinus sanguin; en fait dès qu'il a crevé la pseudo-basale il se produit toujours autour de lui un afflux de cellules migratrices qui se condensent en l'un des amas parenchymateux déjà décrit (*mc*), sorte de pont par lequel le parasite parvient au tissu chloragogène.

3° La réaction de l'organisme parasité.

J'intercale ici l'étude de la réaction provoquée par le parasite sur les tissus et de l'involution qui en résulte souvent car elle ne peut être séparée de celle des stades épithéliaux et sous-épithéliaux: en effet dès qu'il est arrivé dans le chloragogène typhlosolien ou dans le cœlome le Sporozoaire ne paraît plus donner lieu à une réaction rendue appréciable par des phénomènes morphologiques, quelle que soit l'intensité de l'infection; on peut il est vrai attribuer à des processus chimiques de défense la dégénérescence de certains individus dont nous parlerons en son temps.

L'épithélium ne manifeste comme nous l'avons dit que des phénomènes d'atrophie, contrairement à ce qu'on a décrit autour de beaucoup d'autres Sporozoaires (voir BRASIL, SIEDLECKI etc.); mais tandis qu'il est encore inclus entre ses cellules le jeune sporozoïte peut déterminer un afflux de leucocytes qui l'exterminé dès ce stade. On trouve à des niveaux variés une sorte de cellule géante à 6 ou 8 noyaux et protoplasma très labile et difficile à fixer, qui résulte de la confluence de plusieurs d'entr'eux et aboutit à la résorption complète du corps étranger (fig. B dans le texte); la cellule est ensuite frappée de dégénérescence et se rétracte dans sa loge en un bloc homogène avec ou sans quelques débris basophiles (même figure, à la base). Le bien fondé de l'interprétation que je donne de ces apparences sans avoir vu le sporozoïte est démontré par le fait que je les ai trouvées uniquement dans des intestins où les formes jeunes étaient très abondantes et provoquaient aussi une forte réaction leucocytaire. Celle-ci est très variable d'un animal à l'autre.

Aux stades sous-épithéliaux de plus grande taille correspondent

des cellules géantes plus développées, semées de nombreux noyaux en pycnose qui prennent uniformément la laque ferrugine ou l'éosine, et renfermant souvent au centre un reste du corps étranger (pl. 12 fig. 27, *lc*). Autour des très gros parasites la confluence des leucocytes n'a pas lieu: on trouve la cavité épithéliale obstruée par un tampon de cellules migratrices plus ou moins reconnaissables au début où elles entourent un débris, puis transformées en petits blocs qui prennent l'orange uniformément sauf un point noir, reste du noyau (fig. C dans le texte). L'attaque des Sporozoaires au niveau du sinus se fait de la même façon, mais les leucocytes y succombent moins facilement et s'organisent en général en un

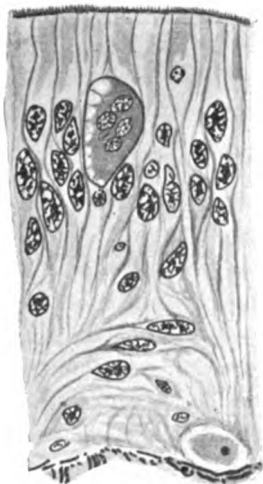


Fig. B.
Phagocytose du sporozoïte dans l'épaisseur de l'épithélium intestinal. $\times 780$.

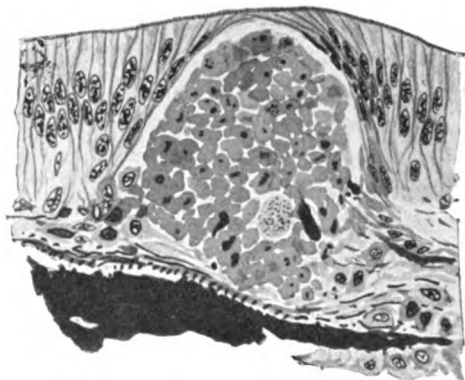


Fig. C.
Amas de leucocytes dégénérés après la phagocytose d'un parasite évolué dans l'épithélium. $\times 465$.

amas parenchymateux stratifié, un peu plus condensé que les amas normaux. La dégénérescence du parasite s'exprime par la pycnose du noyau, l'apparition de nombreux grains basophiles irréguliers dans le cytoplasme qui finit par devenir à peu près uniformément chromatique (fig. D dans le texte), se fragmente et se résorbe.

De semblables amas parenchymateux peuvent se rencontrer dans l'épithélium même, obturant les cavités de grande taille laissées par la résorption du parasite et des premiers phagocytes (celle de la fig. D dans le texte, est due à l'action de plusieurs individus comme dans la fig. E) et se continuant toujours, à travers une lacune dans la pseudo-basale, avec ceux du sinus. Peut-être même ce processus de cicatrisation s'accomplit-il quelquefois derrière des parasites tom-

bés normalement dans celui-ci, ce qui explique l'absence de cavités ou de dépressions persistantes de l'épithélium qui devraient subsister après eux dans les individus très infectés.

L'endoderme semble prendre une faible part à sa propre réparation; j'ai pourtant vu quelques mitoses dans la paroi d'un kyste qui ne renfermait plus qu'un amas granuleux n'en occupant qu'une faible partie.

Il arrive le plus souvent que le parasite triomphe dans la lutte, mais rarement que son triomphe aille jusqu'à nuire à l'hôte qui supporte à merveille une infection intense hors de l'épithélium. Un seul échantillon m'a montré une destruction presque complète de ce dernier par un nombre énorme de parasites (fig. E dans le texte); les phagocytes n'avaient pu triompher que d'un petit nombre d'individus et s'étaient fusionnés en une masse amorphe autour des autres qui avaient creusé et résorbé l'endoderme sur la plus grande partie de son étendue; l'état n'était évidemment pas compatible avec une survie prolongée.

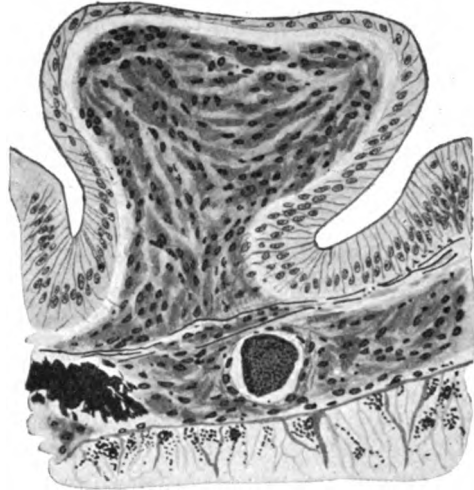


Fig. D.

Envahissement par le tissu conjonctif des cavités creusées dans l'épithélium. Au dessous de la musculature sous-endodermique, un trophozoïte en dégénérescence. $\times 210$.

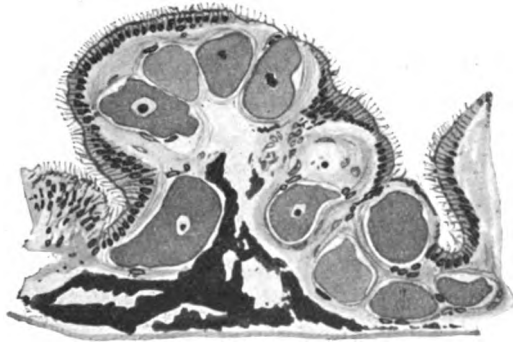


Fig. E.

Destruction de l'épithélium par une infection intense. $\times 210$.

4° La fin de la croissance — la répartition dans l'hôte.

Reprenons à présent le parasite au niveau du sinus sanguin où nous l'avons laissé et supposons pour le moment qu'il se trouve du côté du typhosolis. Du mésenchyme il passe immédiatement dans les lobes de choragène qui remplissent celui-ci et y achève sa croissance qui l'amène à une taille considérable: 310 sur 220 μ au maximum; la fig. 3 de la pl. 11 qui en donne une idée par rapport aux fig. 1 et 2 dessinées à la même échelle ne représente pas encore ce maximum. Les cellules chloragènes sont à peine comprimées autour de lui. L'écorce formée de cellules épithéliales que nous avons décrite est entraînée par l'animal avec lui et persiste durant toute sa croissance; elle devient d'une minceur extrême (*ec*), mais sur des coupes tangentielles on y distingue encore en des points favorables les noyaux complètement laminés et pourtant peu altérés. On distingue aussi des restes des fibres musculaires sous-épithéliales (*mse*) entraînées par le trophozoïte qui les a distendues sans les rompre (peut-être d'ailleurs en existe-t'il normalement quelques-unes éparses dans le typhosolis), et elles peuvent causer des erreurs d'interprétation. Elles dépriment et traversent l'enveloppe amincie et s'incrudent dans le protoplasma même du parasite au point de pouvoir être prises pour des myonèmes qui n'existent pas en réalité. Elles provoquent aussi parfois des dépressions et des étranglements dont l'un peut couper en deux le trophozoïte, et fournir sur une section donnée l'apparence d'un enkystement à deux; il faut suivre la série pour reconnaître la vérité. A part ce cas et celui (assez rare également) où deux parasites se déforment par compression réciproque au point de simuler aussi une conjugaison, mais avec persistance de la paroi qui les sépare à tous les stades, la forme du trophozoïte adulte est régulièrement ovoïde plutôt que sphérique.

Le protoplasma (fig. 3) montre toujours la même structure alvéolaire; une légère condensation des alvéoles et des grains nodaux à la périphérie est la seule différenciation qu'il montre. Sur certaines préparations j'ai trouvé des traînées sidérophiles qui le marbrent de gris violacé sur fond jaune (HEIDENHAIN-orange); mais je suis enclin à croire qu'elles ne sont dues qu'à une fixation défectueuse. Le noyau atteint un diamètre de 30 μ . Sa membrane, très nette, est en général un peu ratatinée et plissée ce qui paraît dû aussi à l'action du fixateur car il y a souvent un léger décollement du protoplasma à ce niveau. La laque ferrique n'y montre qu'un

gros nucléole rond et quelques grains beaucoup plus petits dans un suc assez colorable. La méthode de MANN colore toujours le premier en rouge (un petit globule semble parfois s'en détacher, prélude des transformations ultérieures), et montre accolées à lui une ou deux petites masses bleues qui sont l'idiocromatine — dans le sens où l'on emploie d'habitude ce mot en pareil cas — (pl. 12 fig. 22). Parfois elle paraît logée à l'intérieur même du nucléole (pl. 12 fig. 21). mais communiquant avec l'extérieur par un petit canal, ce qui rappelle en beaucoup plus simple les aspects figurés par LÉGER et DUBOSQ (1908) dans le schizonte d'*Aggregata* (pl. 7 fig. 48).

Le moment est venu de préciser la répartition des formes adultes et sporulées dans l'hôte. Sur plus de cent individus de Terrénès que j'ai examinés à différentes saisons je n'ai vu qu'un ou deux qui ne parussent pas infectés, encore un examen plus approfondi eut-il sans doute permis de trouver quelques jeunes formes. Dans les individus peu infectés, qui sont rares, on rencontre quelques adultes dans le typhlosolis de l'intestin proprement dit et là seulement; mais le plus souvent il en est rempli (plus encore que dans la fig. 1 dans le texte) au point que le chloragogène a presque disparu et qu'au terme de l'évolution sa coupe n'est qu'un réseau d'énormes alvéoles renfermant des spores. Dans le feuillet externe de la paroi au contraire le chloragogène péritonéal ne renferme jamais aucun parasite bien que les jeunes stades puissent être nombreux dans le sinus sous-jacent; la cause en est évidemment l'épaisseur et la continuité de la basale du péritoine. En suivant l'intestin vers ses deux extrémités nous voyons les *Rhytidocystis* se raréfier vers le bas eu égard au déplissement du typhlosolis, rester abondants au contraire dans la région des glandes claviformes ou celui-ci est très grand et plissé et persister, sous forme de quelques individus pouvant arriver à la sporulation, au milieu des replis de l'estomac, où quelques petits lobes de chloragogène expliquent sans doute leur présence.

Mais en dehors du tube digestif nous trouvons dès que l'infection est un peu intense des individus nombreux dans la cavité générale, où ils flottent mélangés aux produits génitaux et aux curieux globules ramifiés et renfermant un long bâtonnet chitinoïde si caractéristiques des Ophélies. Ils parviennent avec eux jusque dans la pointe du lobe céphalique. Ce sont presque toujours des animaux arrivés à complet développement, en général sporulés, très visibles à l'œil nu car ils tranchent comme des grains d'un blanc opaque sur la bouillie brunâtre, plus claire chez les mâles, que forment les autres éléments.

C'est surtout dans la partie caudale du cœlome latéralement à l'intestin que (comme l'a noté HENNEGUY dans son espèce) ils s'amassent et s'agglutinent en masses blanchâtres striées de brun par les globules, comparables à une semoule épaisse et si compactes qu'on peut les retirer pour les fixer à part; mais on trouve aussi de ces masses dans la partie céphalique, à la face ventrale de l'œsophage notamment. Je n'ai point observé comme l'auteur précédent que les phagocytes fussent très abondants autour d'eux.

Par quelle voie le Sporozoaire parvient-il dans le cœlome? La première idée qui vient à l'esprit est que ce sont les individus développés dans la paroi externe de l'intestin qui y tombent tandis que les autres s'arrêtent dans le typhlosolis. En réalité, je la crois tout à fait erronée n'ayant pu déceler aucun stade du passage à travers le péritoine qui, si rapide soit-il, ne saurait être instantané; les jeunes formes du sinus doivent être arrêtées définitivement par sa basale et dégénérer sur place. A mon avis c'est par le hile du typhlosolis où celle-ci est comme nous l'avons vu amincie, dédoublée et sans doute perforée que les parasites poussés par la *vis a tergo* parviennent au cœlome, ce qui explique qu'on y trouve surtout des formes adultes: j'ai rencontré des individus fixés au péritoine externe près de cet endroit, au niveau du vaisseau et de ses ramifications; c'est le seul point en dehors du tube digestif où on les trouve adhérents aux tissus.

Disons un mot ici des formes de dégénérescence qui s'observent à la fin de la croissance. On trouve encore à la périphérie du typhlosolis des formes entourées et résorbées par le tissu conjonctif suivant le mode que nous avons décrit. Mais en outre il arrive, rarement, que des trophozoïtes parvenus à l'état adulte dans le chloragène subissent la même dégénérescence sans que la réaction des tissus paraisse intervenir: le corps se rétracte, le noyau se réduit à un bloc noir homogène (pl. 11 fig. 16) et des granulations sidérophiles irrégulières apparaissent dans le protoplasma qui finit par devenir en entier coloré; puis la fragmentation s'effectue. Dans d'autres cas le processus est tout différent: le protoplasma non rétracté paraît au contraire homogène et très clair, faiblement coloré en jaune avec l'hématoxyline-orange, en bleu avec la méthode de MANN. Le noyau s'est dissocié en trainées de granulations noires ou rouges suivant le cas (pl. 12 fig. 28). La désagrégation se produit d'un seul coup.

5° La sporulation.

Le trophozoïte adulte subit pour se transformer en sporonte une série de modifications que nous allons analyser. Tout d'abord

le noyau se ratatine de façon plus accentuée et émet dans le protoplasma des éléments chromatiques figurés (pl. 11 fig. 4 et 5). Il ne faut pas se laisser impressionner par la régularité qu'offrent parfois ces figures et qui donne l'apparence d'un véritable petit noyau issu par bourgeonnement du principal ce qui pourrait annoncer un processus de réduction chromatique, ou bien d'un pronucléus mâle prêt à se fusionner avec celui-ci; l'examen des coupes voisines et d'autres individus montre que la vésicule, qui semble se produire par „soufflure“ en un point de la membrane nucléaire, est de forme très irrégulière et renferme un nombre variable de grains qu'elle laisse échapper; certains quittent le noyau isolément par d'autres solutions de continuité de la membrane. De plus par la méthode de MANN toutes ces émissions prennent uniquement l'éosine. On les retrouve bientôt groupées irrégulièrement dans la région corticale, devenue plus sidérophile, du sporonte, où elles dessinent souvent des figures en diplosome et en chapelet et se résolvent en grains plus petits.

Tandis que ces émissions se produisent, le noyau jusqu'à ce moment central commence à se déplacer peu à peu vers la périphérie. Dans la zone corticale apparaissent de petits blocs irréguliers d'une substance prenant l'orange qui très probablement dérive des grains sidérophiles émis par le noyau et doit servir à la formation du kyste; c'est à ce moment en effet que celui-ci est sécrété et sa présence ne se manifeste que grâce à la rétraction concomitante du protoplasma, absolument comparable à celle d'un œuf dans sa membrane après fécondation. Il est très mince, et difficile à distinguer sur les coupes de l'écorce formée de cellules épithéliales laminées; on le voit au contraire aisément sur les individus flottant dans la lumière qui ont en général perdu celle-ci. Le décollement se fait d'abord en des points limités à la périphérie du sporonte (pl. 11 fig. 5); puis il s'étend à toute sa surface en lui laissant un aspect irrégulier et ratatiné, tandis que le kyste garde la taille et le contour du trophozoïte adulte. A ce stade on aperçoit souvent dans le protoplasma, au centre ou sur les bords, des plages à structure plus homogène, de coloration grisâtre tranchant sur la teinte jaune du reste (avec l'orange) et renfermant quelques granulations éparses (même figure).

Au stade suivant le parasite, ayant atteint le maximum de sa rétraction, s'est de nouveau arrondi en restant adhérent à la paroi par toute une de ses faces (fig. 1 dans le texte, γ et δ). Le noyau est arrivé à toucher presque la surface et s'est gonflé d'une façon qui contraste avec son état précédent (pl. 11 fig. 6). On aperçoit

alors le nucléole fragmenté en une série de petites boules de taille diverse. Puis la membrane perd sa netteté, le noyau s'applique complètement à la surface où il s'étale peu à peu et n'est plus qu'une plage assez sidérophile de forme irrégulière remplie d'inclusions noires de toutes les tailles qui paraissent s'échapper dans le protoplasma. C'est tout ce que l'hématoxyline ferrique permet de voir; la méthode de MANN nous montre au milieu d'un contenu nucléaire granuleux et violacé les débris du nucléole colorés uniformément en rouge; il en subsiste en général un plus gros qui renferme une énorme vacuole (pl. 12 fig. 23 et 24). Leur passage dans le protoplasma est tout à fait net et paraît fournir matière à la multiplication des grains nodaux également éosinophiles qui s'effectue au même moment. Ces phénomènes sont à rapprocher de l'expulsion du karyosome dans le protoplasma vue notamment par SCHAUDINN dans la maturation du macrogamète de *Coccidium Schubergi* et par SIEDLECKI au stade correspondant chez *Caryotropha Mesnili*; mais ici ils sont toujours précédés de sa fragmentation. Le grain bleu qui existait dans le noyau au repos est très difficile à suivre car (comme d'ailleurs par la méthode au fer) il ne se colore à ce stade pas plus que le suc où il est plongé. Nous reviendrons sur le procédé par lequel il donne naissance aux figures de divisions que nous allons étudier.

Un peu plus tard en effet l'écorce basophile formée par l'ancien noyau s'est étendue en s'amincissant sur plus d'un hémisphère du sporonte, et s'est fractionnée à sa surface en petites cupules séparées qui ne renferment plus de grains colorables. Au centre de chacune de ces cupules on distingue alors un bâtonnet long de $2\ \mu$ seulement atténué et un peu incurvé, en croissant à concavité externe, directement sous-jacent à la surface. Sur les coupes normalement colorées il se teint en noir uniforme par l'hématoxyline ferrique; mais en poussant beaucoup plus loin la différenciation, on arrive (pl. 11 fig. 9) à décomposer chacun en une zone médiane et deux extrémités colorables séparées par des segments plus clairs — une plaque équatoriale et deux centrioles car on peut du coup les homologuer à des figures de mitose rudimentaires et de taille plus petite qu'aucune de celles qui sont aujourd'hui connues. Si l'on considère la figure donnée par LÉGER et DUBOSCQ des mitoses dans le schizonte d'*Aggregata* (1908, pl. 5 fig. 24 à 26) avec leurs centrioles venant faire saillie à la surface, en couvrant d'un noir uniforme tout l'espace compris entre les fibres les plus externes du fuseau, y compris les chromosomes, on obtiendra quelque chose qui ne différera que par

une taille beaucoup plus grande de notre croissant avant décoloration complète, et c'est précisément cette similitude qui m'a mis sur la voie de l'interprétation. Les deux processus sont comparables, mais le nôtre est d'une simplicité beaucoup plus grande vu l'absence de chromosomes visibles et d'asters ou fuseaux protoplasmiques. On peut aussi à la rigueur le rapprocher des „mitoses karyosomiennes“ figurées par JOLLOS dans la schizogonie d'*Adelea* (pl. XXIII fig. 5) dont il diffère par l'allongement plus grand. Il n'est point difficile de suivre le reste du phénomène de division: la plaque équatoriale se dédouble (fig. 9 dans le haut), puis les deux moitiés du croissant s'écartent, chacune d'elles se fend à partir de l'extrémité centriolaire (on en rencontre formant un angle plus ou moins ouvert), et, les deux parties arrivées dans le prolongement l'une de l'autre, la métaphase dont nous sommes partis se trouve reconstituée.

Plus tard encore, quand les petits noyaux ont entouré le sporonte entier qui à ce moment s'est arrondi et ne touche plus les parois du kyste, et commencent à se rapprocher les uns des autres, on rencontre des divisions d'un type tout différent (pl. 11 fig. 10) et notablement plus grandes. On voit alors à chaque pôle une rosette formée de cinq ou six chromosomes irréguliers, et entr'elles une centrodosome toujours incurvée vers le dedans et qui aboutit à des centrioles difficiles à voir avec certitude au centre de chaque rosette. L'aspect se rapprocherait plutôt des mitoses du microgamétocyte d'*Angeiocystis* d'après BRASIL (1909), de la schizogonie de *Coccidium Schubergi* d'après SCHAUDINN (1900) et des divisions du micronucléus chez les Infusoires. A la fin du processus, quand les noyaux se touchent presque, on les voit simplement s'étrangler en biscuit entre les deux rosettes qui viennent se placer tangentiellement à la surface (pl. 11 fig. 11). Comment s'opère le passage d'un type à l'autre? Sans avoir pu le suivre en détail vu la difficulté de l'objet, je suis convaincu que la centrodosome du second type correspond à la figure tout entière du premier, très étirée (quelques grains au milieu de cette centrodosome représenteraient la plaque équatoriale primitive), et que les chromosomes sont quelque chose de surajouté autour d'elle au cours des mitoses successives. Je croirais du reste volontiers qu'ils existent dès le début, mais ne sont pas alors plus colorables que le plasma de l'ancien noyau qui les baigne et ne peuvent être décelés. Ainsi s'expliquerait le passage d'une mitose à centrioles externes par rapport à la masse chromatique visible à une mitose à centrioles internes. Je renvoie pour les rapprochements non très étroits, mais très instructifs, à faire avec

les modes de division dans les autres groupes de Protistes, Amœbiens en particulier, à la synthèse qu'en a donné CHATTON (1910).

La fig. 7 et 8 de la pl. 11 où il semble exister entre les deux moitiés bien séparées du croissant une plaque équatoriale à grains irréguliers, bien visible surtout sur des coupes obliques sur son axe (fig. 8 où elle est dédoublée) pourrait être envisagée comme un passage entre les deux types. En réalité elle se rapporte à un stade précoce où les petits noyaux sont encore peu nombreux, comme l'indique aussi leur grande taille relative, et les grains équatoriaux en question, peu distincts de ceux du protoplasma, sont sans doute les derniers débris du nucléole orientés par rapport à la division. Ceci confirme l'idée que les premières divisions de l'idiochromatine que j'ai cru apercevoir au sein du noyau primitif appartiennent au même type; elles commencent avant le moment où celui perd son individualité et l'on peut parler somme toute d'une division multiple intranucléaire comme JOLLOS en a donné le type chez la Coccidie *Adelea ovata*. Sans doute la première division est précédée d'un stade de spirème et de reconstitution nucléaire analogue à celui qu'ont décrit LÉGER et DUBOSCQ, mais encore moins colorable que dans leur cas et beaucoup plus petit; il correspondrait au moment où l'on ne distingue dans le noyau nulle trace de la chromatine cyanophile ou seulement quelques filaments très ténus comme dans la fig. 6. On peut aussi rapprocher ces phénomènes de la reconstitution du micronoyau au sein des débris du noyau primitif que les mêmes auteurs nous ont fait connaître (1909) dans la formation des gamètes chez la Grégarine *Nina gracilis*. Tout ceci prouve qu'on ne saurait regarder de trop près avant de se prononcer sur des phénomènes de ce genre. Avec un peu de négligence dans la différenciation et l'examen des coupes le stade aux croissants de $2\ \mu$ m'aurait facilement échappé et j'aurais pu parler d'une écorce chromidiale sans structure reconstituant les noyaux *de novo*, tandis qu'en réalité les phénomènes mitotiques sont parfaitement continus d'un bout à l'autre de la sporogénèse.

Nous voici arrivés à un stade de „perlage“ typique où la surface du sporonte est couverte de petits noyaux arrondis, encore gémés par place, tangents les uns aux autres, mal délimités du côté interne mais montrant au dehors la calotte de chromosomes plus ou moins distincts (pl. 11 fig. 11). Le protoplasma est devenu très compact et chargé de grains colorables par l'hématoxyline ferrique et l'éosine. La forme, parfaitement sphérique, subit alors un nouveau changement: elle se déprime sur une des faces et passe à celle

d'une calotte qui donne sur les coupes suivant le niveau et l'orientation un contour tantôt régulièrement arrondi, tantôt annulaire, tantôt en croissant (fig. 1 dans le texte, ϵ et ζ). Assez rarement le processus va plus loin et découpe cette calotte en une série de cordons anastomosés dont chacun se hérissera de sporoblastes. En même temps apparaît à la périphérie, sous les noyaux, une zone prenant l'orange avec intensité, formée d'un protoplasma très finement spongieux, sans inclusions, qui contraste avec la zone centrale de plus en plus granuleuse et chromatique dont la rétraction a déformé le sporonte (pl. 11 fig. 12 et 13). Des cloisons radiaires s'y forment dès le début et chaque noyau surmonte une petite colonnette de protoplasma trois ou quatre fois plus haute que lui, polyédrique par pression réciproque comme le montre la coupe en partie tangentielle de la fig. 13. A maturité enfin chacune se détache en emportant avec elle un peu de protoplasma granuleux et reprend rapidement une forme ovoïde: le sporoblaste est constitué. Il montre à un bout (pl. 12 fig. 26) le noyau avec sa calotte de filaments radiaires, irréguliers, à l'autre le petit amas d'inclusions, moins sidérophile mais franchement éosinophile, dont nous venons de parler. Souvent on observe sur une de ses faces une strie colorable qui paraît prolonger un des filaments du noyau. Aussitôt le sporoblaste libre, le résidu protoplasmique se fragmente en une série de boules à protoplasma alvéolaire comme le sien où les inclusions se résorbent et qui disparaissent rapidement (même figure).

La transformation du sporoblaste en spore comprend deux processus dont le synchronisme ne paraît pas absolument constant: la sécrétion de la membrane et la division du contenu (pl. 11 fig. 14). Le noyau se déplace vers le milieu et se coupe obliquement par un procédé qui paraît identique à celui des dernières divisions précédentes et d'ailleurs peu différent de ce qui est connu dans les sporoblastes de Grégarine (voir LÉGER et DUBOSCQ 1909). Le résidu granuleux est alors disparu. Le clivage du protoplasma se produit aussi obliquement et sépare les deux sporozoïtes en virgule, ayant près de l'extrémité pointue un noyau à membrane peu nette et chromatine dissociée, laissant entr'eux un espace au centre de la spore elliptique et aplatie. Sa membrane à ce moment prend la plupart des colorants avec intensité, de sorte que l'hématéine seule permet une bonne mise en évidence du contenu.

Les spores dissociées mesurant $12 \times 7 \mu$ environ paraissent remplir à nouveau tout le kyste, noyées dans un liquide un peu albumineux qui se rétracte souvent avec elles lors de la fixation. Ce

stade est d'ailleurs le plus fréquent non seulement dans le cœlome mais dans le typhlosolis sauf chez les individus très peu infectés. Elles ne peuvent arriver au dehors qu'avec les produits génitaux, c'est à dire par déhiscence de la paroi du corps, l'Ophélie ne possédant aucun orifice préformé. J'ai vu souvent sur mes animaux à l'état de maturité, de juin à septembre, conservés dans des cuvettes, une excoriation du tégument se produire dans la région céphalique en général et laisser échapper tout le contenu du cœlome. L'animal reste alors flasque et immobile et ne tarde pas à périr, ce qui mettra en liberté les spores encore enfermées dans le typhlosolis. J'ignore bien entendu si ce processus est normal (BENHAM dans Cambridge Natural History cite le genre *Ophelia* parmi ceux qui possèdent une ponte agglomérée; je n'ai pu trouver nulle part ailleurs mention du fait, qui me paraît peu croyable). Les spores mélangées au sable sont sans doute réavalées par un autre animal voisin et permettent une nouvelle infection qui dans ces conditions peut être très intense (nous discuterons dans le dernier chapitre l'éventualité d'un hôte intermédiaire). En tous cas le même animal doit subir plusieurs contaminations successives car on y trouve en général deux ou trois stades différents, de nombreux individus à chacun mais pas d'intermédiaires. Le degré d'infection paraît d'ailleurs assez exactement proportionnel à la taille, c'est à dire à l'âge.

Des phénomènes de dégénérescence comparables à ceux des stades végétatifs peuvent aussi se produire aux divers moments de la sporulation; ils aboutissent en général à des kystes renfermant quelques spores mêlées à des stades plus jeunes et à des sphérules de protoplasma altéré.

6° Les formes intra-intestinales, leur signification.

On rencontre dans l'intestin des Ophéliés diverses formations dont il est nécessaire de discuter les rapports avec le cycle que nous venons d'étudier. Il en est une d'abord qui ne prête guère à confusion: c'est une Grégarine du genre *Doliocystis* LÉGER (voir BRASIL 1909) qui, sans être aussi constante que la *Rhytidocystis*, est très fréquente et souvent très abondante dans le tube digestif. On la rencontre d'un bout à l'autre de celui-ci, mais elle paraît avoir une prédilection pour l'œsophage, l'estomac et la première partie de l'intestin, en un mot pour la région où se rencontrent les glandes claviformes; il semble surtout que les individus des autres régions

disparaissent plus rapidement chez les animaux conservés en captivité. N'ayant rien vu de son cycle évolutif, je juge inutile de lui attribuer un nom. C'est une forme très effilée du moins pour les individus adultes car la croissance se fait en longueur beaucoup plus qu'en largeur, atténuée graduellement aux deux bouts, très transparente sur le vivant et peu mobile. Le noyau est central. Elle est fixée par un court pédoncule hyalin à une cellule intestinale qui paraît altérée. D'après ses caractères, elle semble se rapprocher surtout de *D. elongata* (MINGAZZINI). J'ai vu des individus recourbés et contractés qui se disposaient sans doute à s'enkyster, je n'ai jamais observé ni syzygies bien nettes, ni kystes formés. Je n'ai jamais vu de stades intra-épithéliaux pas plus d'ailleurs que BRASIL dans sa *D. legeri*.

J'ai déjà dit que les stades jeunes de *Rhytidocystis* pouvaient retomber dans la lumière par rupture de l'épithélium. On les y trouve souvent assez abondants, surtout bien entendu quand on a manipulé l'intestin sans précaution. Sur le vivant on les reconnaît immédiatement des *Doliocystis* à leur forme très trápue, ovoïde, et à leur transparence moins grande. On les trouve facilement aussi sur les coupes. Ils paraissent être éliminés sans modification.

Arrivons à des formes plus embarrassantes. J'ai rencontré en grande abondance, dans un intestin au moins, des parasites de taille analogue à celle des précédents, mais fixés à l'épithélium au niveau d'une crypte par les cils agglutinés des cellules qui tapissent celle-ci. Presque toujours l'animal est plus ou moins piriforme, le col s'engageant dans la crypte comme s'il y avait été aspiré (fig. F dans le texte). Les cils sont réunis en fibres noires irrégulières s'attachant en divers points de la surface; sur certaines coupes on a l'apparence d'un crampon unique, ramifié, partant du parasite pour s'attacher aux cellules, analogue à celui qui existe chez certaines



Fig. F.
Forme intestinale fixée aux cils.
× 600.

Doliocystis; mais c'est une simple illusion. J'ai cru d'abord qu'il s'agissait de *Rhytidocystis* ayant commencé à croître dans la lumière et devenant ensuite sous-épithéliales par la fermeture de la crypte sur elles; j'ai même exposé cette hypothèse dans ma note préliminaire; mais elle est certainement inexacte. J'ai supposé ensuite qu'il s'agissait bien de *Rhytidocystis*, mais retombées secondairement

dans la lumière et fixées aux cellules, comme il arrive pour *Lankesteria ascidia* d'après SIEDLECKI; la chose reste possible, mais j'hésite à l'admettre en raison des caractères du noyau: au lieu qu'il ait autour du nucléole un suc assez foncé renfermant quelques petits grains chromatiques, celui-ci est très clair et montre un véritable réseau de grosses granulations noires. Est-ce un indice d'altération, de même que les vacuoles qui apparaissent parfois dans le cytoplasme? Peut être, mais je n'ai pas vu d'intermédiaire entre ces formes et les *Rhytidocystis* de la lumière, abondantes dans les mêmes coupes où l'épithélium était en fort mauvais état. On peut aussi supposer que c'est un stade, préliminaire à l'enkystement sans doute, de la *Doliodocystis*; mais le noyau de celle-ci est plus petit et beaucoup moins nettement réticulé. Enfin ce peut être un troisième parasite. Je laisse ouverte la question, peu importante d'ailleurs vu le caractère exceptionnel de ces formations.

***Rhytidocystis opheliae* HENNEGUY parasite
d'*Ophelia bicornis* SAVIGNY.**

Il nous sera facile à présent de mettre en parallèle avec ceux de *Rh. henneguyi* les stades observés par cet auteur sur un matériel beaucoup moins riche et que j'ai pu étudier dans ses préparations. Les formes intestinales que j'ai rencontrées sont de taille relativement grande et occupent presque toute la hauteur de l'épithélium, d'ailleurs plus bas que chez *O. neglecta* (pl. 11, Fig. 17). Je n'ai point observé les jeunes stades situés tout à fait à la base ni le passage dans le sinus; il est probable qu'il y a également formation d'une écorce épithéliale car HENNEGUY signale une enveloppe à double contour distincte du kyste de sporulation.

Je n'ai jamais rencontré un seul individu de *Rh. opheliae* dans le typhlosolis, où le chloragogène est d'ailleurs beaucoup moins développé (elle ne s'observe pas davantage dans le péritoine, non plus que dans les autres tissus). C'est dans la cavité générale seule qu'on rencontre les trophozoïtes, en général en très petit nombre, parfois en quantité comparable à celle du *Rh. henneguyi* dans un individu bien infesté. Comme je ne l'ai pas rencontrée non plus au stade de passage dans les tissus, il faut admettre que la migration se fait à un stade précoce et avec une grande rapidité, probablement par le typhlosolis et son hile comme dans l'autre cas.

A partir d'une certaine taille la forme devient très caractéristique: elle est aplatie en une lentille à bords tranchants, déprimée en deux points opposés de la circonférence, de l'un à l'autre desquels courent des rangées méridiennes de plis perpendiculaires, très irréguliers et non parallèles entr'eux (fig. G dans le texte). Elles sont séparées par des bandes de protoplasma nu. Les plis peuvent être compliqués par des subdivisions comme l'indique HENNEGUY dans une figure de détail. Je donne une coupe du trophozoïte un peu oblique sur l'axe qui joint les deux dépressions de sorte qu'elle intéresse plusieurs groupes de plis (fig. H).

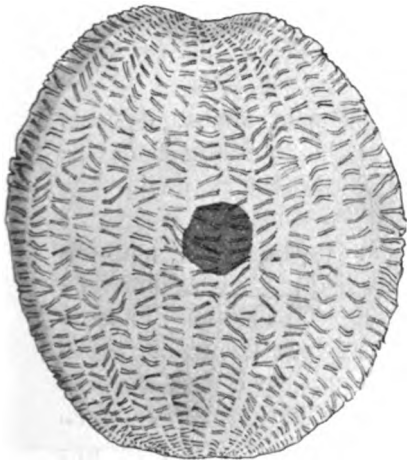


Fig. G.
Rhytidocystis opheliae, trophozoïte adulte,
vu en plan. $\times 150$.



Fig. H.
Rhytidocystis opheliae,
coupe d'un trophozoïte
adulte. $\times 150$.

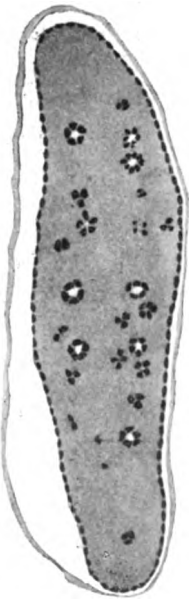


Fig. J.
Rhytidocystis opheliae,
coupe d'un kyste montrant
le stade de perlage. $\times 150$.

Le processus de sporulation, dont il n'existe que quelques stades isolés dans les préparations de M^r HENNEGUY, paraît tout à fait analogue à celui que j'ai décrit; la forme du sporonte change peu, les bords de la lentille seuls deviennent plus obtus et les stries s'effacent; par contre les noyaux, au lieu de s'étaler tous à la périphérie, se groupent aussi autour de cavités qui se creusent dans le protoplasma; il est donc probable que leurs divisions ne se sont pas faites uniquement à la surface. Le but de ce processus est toujours

l'augmentation de celle-ci et elle a de nombreux analogues parmi les Sporozoaires. La spore adulte est nettement plus petite que celle de *Rh. henneguyi* ($8 \times 5 \mu$ environ), mais semblable à part quelques détails insignifiants (pl. 11 fig. 18): membrane plus mince, espace libre entre les deux sporozoïtes presque nul; ceux-ci ne sont pas atténués graduellement, mais se rétrécissent tout d'un coup en avant du noyau en une petite pointe qui n'a pas été figurée par HENNEGUY. Cet auteur en a observé qui renfermaient exceptionnellement quatre sporozoïtes; il insiste sur le fait que les kystes sont de taille très dissemblable, bien qu'il n'y ait qu'une espèce de spores; le trophozoïte semble pouvoir sporuler à tous les états de développement. La chose ne s'observe pas au même degré chez *Rh. henneguyi* où les différences de diamètre n'excèdent pas le rapport du simple au double. J'ai signalé autrefois un phénomène tout à fait analogue chez *Porospora legeri* DE B. (1911).

Discussion et conclusion.

Après l'exposé objectif des faits auquel nous venons de nous livrer, il y a lieu de discuter les deux questions principales qui se posent à propos du genre *Rhytidocystis*: 1° Y-a-t'il chance qu'il existe à un moment quelconque du cycle une fécondation véritable? 2° Quelles sont les affinités de ce genre, dans quel groupe des Sporozoaires *sensu stricto* de LÉGER et DUBOSCQ (1910) [Rhabdogéniens de DELAGE et HÉROUARD, Télésporidies de SCHAUDINN], auxquels il appartient sans contestation, convient-il de le ranger. Comme il est à peu près impossible de les séparer, nous suivrons pour cette discussion le plan suivant: d'après ce que nous connaissons du groupe en question nous ne pouvons faire sans tomber dans la fantaisie que trois hypothèses sur le moment de la fécondation: ou bien deux individus contigus donnent naissance par des divisions successives et synchrones à des gamètes peu différents qui se réunissent deux par deux pour former les sporoblastes (type grégarinien); — ou bien certains trophozoïtes évoluent sans modification en macrogamètes, certains autres forment à leur surface de petits microgamètes qui fécondent les premiers; l'œuf résultant se divise à son tour et fournit enfin les sporoblastes (type coccidien); — ou bien, simple modalité du cas précédent, la fécondation plus ou moins hétérogamique se place non au terme, mais au début de la croissance, et une période végétative assez longue la sépare de la division (type hémosporeidien où d'ailleurs le g. *Hepatozoon* MILLER seul arrive à former de véritables

spores). Nous allons rapprocher successivement *Rhytidocystis* de chacun de ces groupes en faisant valoir pour chacun les caractères morphologiques ou éthologiques qui peuvent confirmer le rapprochement et en discutant en même temps la possibilité d'une parthénogenèse dans l'un des trois cycles.

1° Hypothèse grégarinienne. — C'est aux Grégarines que HENNEGUY a d'abord rapporté *Rhytidocystis*, et il est certain que le trophozoïte, ne fût-ce que par sa grande taille, suggère à première vue une Monocystidée cœlomique. L'analogie de *Rh. opheliae* par son système de plis réguliers avec certaines espèces du Lombric comme *M. striata* et *M. crenulata* HESSE est très grande, et l'on ne doit point s'étonner que ce caractère manque dans l'autre espèce étant donné qu'il y a des *Monocystis* parfaitement lisses comme d'autres garnies de poils et d'expansions variées (voir HESSE 1909). Il est vraisemblable que cette différence est due aux conditions d'existence, la première étant toujours libre dans le cœlome (comme les *Monocystis* correspondantes dans les vésicules séminales), la seconde le plus souvent incluse dans les tissus (comme les autres *Monocystis* dans le cytophore de la lignée séminale); la disparition d'un épicyte et d'un sarcocyte si différenciés dans les formes intestinales s'observe de même chez ces espèces plus ou moins immobiles. D'autre part, le nombre normal de sporozoïtes dans la spore des Grégarines est de 8, à part un ou deux genres (*Selenidium* en particulier) qui n'en ont que quatre, et notre forme à deux sporozoïtes se placerait tout à fait à part. Bien entendu il faudrait dans cette hypothèse éliminer complètement l'idée d'une fécondation, qui implique toujours chez les Grégarines l'enkystement à deux sûrement exclus par les observations de HENNEGUY et les nôtres.¹⁾ De la critique à laquelle se sont livrés SHELLACK (1908) et WOODCOCK (1908) des observations d'enkystement solitaire et fécond dans ce groupe, il résulte qu'en dehors des observations de LÉGER sur *Gonospora* et *Lithocystis* et de CAULLERY et MESNIL sur *Selenidium* qui sont antérieures à la découverte de la véritable fécondation des Grégarines par SIEDLECKI et demanderaient à être reprises quant au détail du phénomène, le seul cas absolument indiscutable est celui d'*Ophryocystis* où LÉGER

¹⁾ On peut songer, en rapprochant les cas douteux de *Schaudinnella* et d'*Aggregata*, où il y a d'ailleurs hétérogamie accentuée, à la copulation entre sporoblastes de deux kystes différents; mais ceux ci sont immobiles et la paroi du kyste reste intacte jusqu'à la maturité de la spore. On peut aussi songer, comme l'a fait HENNEGUY, à l'autogamie entre deux sporoblastes du même kyste; j'ai recherché ce phénomène avec soin et crois pouvoir conclure à son inexistence.

(1907) a observé que de deux gamètes venus en contact l'un pouvait dégénérer et l'autre évoluer seul en spore, ou les deux sporuler indépendamment. Ce cas, observé chez une forme très spéciale et dans des conditions très différentes, ne peut nous servir que comme garant de l'existence d'une parthénogenèse au moins accidentelle chez un Sporozoaire.³⁾

2° Hypothèse coccidienne. — S'imposant moins à première vue, l'hypothèse coccidienne est peut-être plus suggestive à un examen approfondi; les caractères de taille et d'ornementation ne sont pas bien fondamentaux et nous connaissons déjà des Coccidies extra-intestinales de Polychètes comme *Caryotropha* et *Angeiocystis*. L'absence de toute schizogonie démontrée n'est point exceptionnelle et il y a des Coccidies à deux sporozoïtes par spore (*Eimeria*, *Cyclospora*, *Adelea*) comme des Coccidies à spores nombreuses dans l'ookyste (*Barrouxia*, *Caryotropha*, *Klossia*, *Orcheobius* etc.), de sorte qu'il n'y a rien d'étonnant à trouver combinés ces deux caractères qui ne le sont pas dans la classification actuelle. M^r DUBOSCQ me fait remarquer que le noyau du sporozoïte avec sa membrane peu nette et sa chromatine pulvérulente évoque le phylum Coccidies-Hémosporeidies (SIEDLECKI, qui a cité ce caractère, trouve pourtant un karyosome dès le début chez *Caryotropha*); la simplification des mitoses et l'absence d'asters ou de fuseaux protoplasmiques plaide dans le même sens. Enfin il y a une analogie frappante que nous avons fait remarquer en son temps entre les phénomènes qui précèdent la sporulation (déplacement du noyau à la périphérie, expulsion du karyosome, rétraction à l'intérieur du kyste) et ceux qui s'observent chez les Coccidies lors de la pénétration du microgamète (SCHAUDINN, SIEDLECKI, DEBAISIEUX etc.).

On peut se demander jusqu'à quel point l'absence d'une telle fécondation est prouvée: les microgamétocytes peuvent être assez peu nombreux par rapport aux macrogamétocytes et les microgamètes assez

³⁾ Ce travail était déjà à l'impression quand a paru la note où LÉGER et DUBOSCQ (1913), établissant l'identité des *Porospora* des Crustacés avec les *Nematopsis* des Lamellibranches, ont résolu l'énigme que posait l'absence apparente de fécondation dans ces Grégarines; mais cet exemple n'éclaire aucunement notre cas. Les kystes de *Porospora* renfermeraient non des spores définitives, comme le croyait VAN BENEDEN, ni de simples schizozoïtes comme l'ont admis quelque temps les deux auteurs, mais de véritables gamètes, et la différence avec le cas normal est simplement que ces gamètes doivent être mis en liberté et pénétrer dans un autre hôte pour copuler et donner la spore différenciée (à un seul sporozoïte); il est difficile de nier l'homologie de celle-ci avec la spore contenue dans le kyste de *Rhytidocystis*, et de toutes façons la fécondation doit être antérieure.

petits pour m'avoir échappé malgré un examen minutieux. Je crois néanmoins cette éventualité assez peu probable, surtout en ce qui concerne les phénomènes nucléaires que j'ai suivis sans lacune: j'aurais sans doute trouvé le microgamète en voie de pénétration et surtout constaté le „fuseau de fécondation“ étendu dans tout le diamètre de l'œuf qui paraît très constant chez les Coccidies¹⁾, et manque sûrement ici. De plus le déplacement du noyau à la périphérie, au devant du microgamète, précède chez une Coccidie la fécondation et par conséquent la rétraction et la sécrétion du kyste qui en sont la conséquence, et celles-ci lui sont nettement antérieures dans notre forme. Je ne puis me défendre de l'idée qu'il y a eu chez ses ancêtres, peut-être chez elle-même à certains moments, une fécondation à ce stade et qu'il n'en subsiste plus qu'un souvenir dans les conditions où je me suis trouvé²⁾.

3^o Hypothèse hémospordienne. — Le principal avantage de celle-ci serait d'admettre la possibilité d'une fécondation dans la partie du cycle qui m'a échappé, au moment de la pénétration dans l'intestin. Dans tous les cas que nous connaissons jusqu'à présent les gamètes se forment dans un premier hôte et copulent dans le tube digestif d'un animal piqueur. Or il est certain qu'on ne saurait exclure *a priori* l'hétéroïcité en disant, comme BRASIL à propos de la Pectinaire (1907 p. 391), que l'hôte qui vit dans le sable et s'en nourrit ne saurait se prêter à une migration: le Mouton ne mange pas plus la Limnée que la Limnée ne mange le Mouton et pourtant la Douve évolue de la Limnée au Mouton. Ceci nous laisse d'ailleurs dans une indétermination complète au sujet de cet autre hôte. A la rigueur aussi le phénomène (et peut-être la schizogonie qui nous manque) pourrait se passer dans un animal se nourrissant d'Ophélies et dont les déjections les infecteraient à nouveau: Oiseau, Poisson à la rigueur. Crustacé fouisseur; c'est à rechercher à l'occasion. Enfin sans que l'animal soit hétéroïque nous pouvons songer à la simple copulation de deux sporozoïtes mis en liberté dans l'intestin comme elle se fait

¹⁾ BRASIL est le seul qui l'envisage (chez *Angiocyctis*, 1909), comme précédant celle-ci au lieu de la suivre, mais il le figure de la même façon que les autres.

²⁾ L'étude des phénomènes de réduction chromatiques, s'ils présentaient la même netteté que chez les Métazoaires, pourrait fournir d'utiles renseignements sur l'existence d'une parthénogenèse; mais on sait qu'une pareille netteté est exceptionnelle chez les Protistes (*Adelea* d'après JOLLOS les observations de cet auteur ont d'ailleurs été récemment contestées sur plusieurs points par SCHELLACK, (1912) et les processus qu'on a qualifiés d'épuration présentent tous les intermédiaires entre ce cas et les émissions irrégulières en rapport sans doute avec la sécrétion comme nous en avons décrit nous mêmes.

entre les gamètes semblables d'*Hepatozoon* (MILLER). On pourrait d'ailleurs aussi supposer à cette période intra-intestinale des phénomènes de schizogonie; mais sa faible durée, certaine par mes observations négatives, plaide contre ces hypothèses. J'ai vainement cherché à réaliser une infection expérimentale qui m'aurait permis l'étude de ces premiers stades: les Ophélies en captivité, dans d'assez mauvaise condition il est vrai, n'ont point avalé les spores, même mêlées à du marc de café remplaçant le sable, et je n'ai pu réussir non plus à les leur injecter par la bouche ou l'anus. Il n'en est pas moins vrai que toutes ces hypothèses nous écartent beaucoup des Hémosporidies dont le cycle si spécial paraît étroitement lié au passage par un animal piqueur, et je n'ai qu'une foi médiocre dans ce rapprochement.

En résumé, l'absence durable d'un processus sexuel dans le genre *Rhytidocystis* me paraît démontrée, sous réserve de son existence à un stade intra-intestinal ou dans un autre hôte, et c'est des Coccidies que je pencherais à rapprocher en particulier ces formes, qui peuvent représenter d'ailleurs un rameau aberrant du tronc commun des Sporozoaires *sensu stricto* comme nous en connaissons déjà quelques uns.

Index bibliographique.

- 1910 BEAUCHAMP, P. DE: Sur une Grégarine nouvelle du genre Porospora. C. R. Acad. Sc. Paris CLI p. 997—99.
- 1912 —: L'évolution de *Rhytidocystis* Henneguyi n. sp., Grégarine agame parasite des Ophélies. Ibid. CLIV p. 1384—85.
- 1905 BRASIL, L.: Contribution à la connaissance de l'appareil digestif des Annélides Polychètes. L'épithélium intestinal de la Pectinaire. Arch. Zool. Expér. (4), II, p. 91—254, pl. IV—VIII.
- 1909 —: Documents sur quelques Sporozoaires d'Annélides. Arch. f. Protistenk. XVI, p. 107—142, pl. VII—X.
- 1910 CHATTON, E.: Essai sur la structure du noyau et la mitose chez les Amœbiens. Faits et théories. Arch. Zool. Expér. (5), V, p. 267—337.
- 1911 DEBAISEUX, P.: Recherches sur les Coccidies. I. *Klossia helicina* A. SCHNEIDER. La Cellule XXVII, p. 90—111, 1 pl.
- 1886 GIARD, A.: Les habitants d'une plage sablonneuse. Bull. scient. dép. Nord (2) IX, p. 187—96.
- 1908 HENNEGUY, F.: Une espèce nouvelle de Grégarine des Ophélies. C. R. Ass. française Avanc. Sc., XXXVI^e session (Reims), I, p. 247. — Sur une Grégarine parasite des Ophélies. Ibid., II, p. 633—36.
- 1909 HESSE, E.: Contribution à l'étude des Monocystidées des Oligochètes. Arch. Zool. Expér. (5), III, p. 27—301, pl. I—VII.

- 1909 JOLLOS, V.: Multiple Teilung und Reduktion bei *Adelea ovata* (A. SCHNEIDER). Arch. Protistenk. XV, p. 248—62, pl. XXIII—XXIV.
- 1907 LÉGER, L.: Les Schizogrégarines des Trachéates. I. Le genre *Ophryocystis*, Arch. Protistenk. VIII, p. 159—202, pl. V—VIII.
- 1908 LÉGER, L. et DUBOSCQ, O.: L'évolution schizogonique de l'*Aggregata* (*Eucoccidium*) *Eberthi* (LABBÉ). Ibid. XII, p. 44—108, pl. V—VII.
- 1909 — —: Etudes sur la sexualité chez les Grégarines. Ibid. XVII, p. 19—134, pl. I—V.
- 1910 — —: *Selenococcidium intermedium* LÉG. et DUB. et la systématique des Sporozoaires. Arch. Zool. expér. (5), V, p. 187—238, pl. I—II.
- 1913 — — Le cycle évolutif de *Porosporaportunidaum* Frenzel. C. R. Acad. Paris, CLVI, p. 1932—1934.
- 1897 PRUVOT, G.: Essai sur les fonds et la faune de la Manche Occidentale (côtes de Bretagne) comparés à ceux du Golfe du Lion. Ibid. (3), V, p. 511—617, pl. XXI—XXVI.
- 1898 SAINT-JOSEPH, baron DE: Les Annélides Polychètes des côtes de France (Manche et Océan). Ann. Sc. nat. Zool. (8), V, p. 209—450, pl. XIII—XXIII.
- 1894 SCHAEPPPI, Th.: Das Chloragogen von *Ophelia radiata*. Jen. Zeitschr. Naturw. XXVIII p. 247—93, pl. XVI—XIX.
- 1900 SCHAUDINN, FR.: Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool. Jahrb. Anat. XIII p. 197—292, pl. XIII—XVI.
- 1908 SCHELLACK, C.: Über die solitäre Encystierung bei Gregarinen. Zool. Anz. XXXII p. 597—609.
- 1912 — Untersuchungen über die Coccidien aus *Lithobius* und *Scolopendra* (*Barrouxia*, *Adelea*, *Eimeria*). Verhandl. deutsch. zool. Ges., XXII^o Jahresvers. p. 163—179.
- 1892 SCHNEIDER, A.: Sur l'Ophélie du Pouliguen. Tabl. Zool. II, p. 95—109, pl. XIV.
- 1901 SIEDLECKI, M.: Contribution à l'étude des changements cellulaires provoqués par les Grégarines. Arch. Anat. microsc. IV, p. 87—100.
- 1907 —: Étude de la structure et du cycle évolutif de *Caryotropha Mesnili*. Bull. int. Acad. Sc. Cracovie, cl. sc. math. et nat., p. 453—97, pl. XIII—XV.
- 1906 WOODCOCK, H. M.: The life cycle of „*Cystobia*“ *irregularis* (MINCH.) together with observations on other „neogamous“ Gregarines. Quart. Journ. micr. Sc. L, p. 1—100, pl. I—VI.

Explication des planches.

Lettres communes à toutes la figures, texte et planche.

<i>bp</i> = basale du péritoine.	<i>lc</i> = leucocytes.
<i>chp</i> = chloragogène péritonéal.	<i>mc</i> = tissu conjonctif mésenchymateux.
<i>cht</i> = chloragogène typhlosolien.	<i>msc</i> = musculature sous-endodermique.
<i>ctr</i> = centriole.	<i>msp</i> = musculature splanchnopleurale.
<i>cc</i> = écorce de cellules épithéliales autour du parasite.	<i>n</i> = noyau.
<i>en</i> = cellules épithéliales de l'intestin.	<i>si</i> = sinus périintestinal.
<i>k</i> = karyosome.	<i>vv</i> = vaisseau ventral.

Planche 11.

Rhytidocystis Henneguyi DE BEAUCHAMP

(d'après des préparations à l'hématoxyline de HEIDENHAIN-orange G, sauf indication contraire).

- Fig. 1. Jeune trophozoïte à la base de l'épithélium d'*Ophelia neglecta* SCHNEIDER. × 650.
- Fig. 2. Passage du parasite à travers la couche musculaire et dépression de l'épithélium au-dessus de lui. × 650.
- Fig. 3. Trophozoïte presque adulte dans le chloragène du typhlosolis. × 650.
- Fig. 4. Début des émissions nucléaires dans le cytoplasma. × 650.
- Fig. 5. Même stade; début de la sécrétion du kyste et de la rétraction. × 650.
- Fig. 6. Noyau arrivé à la périphérie; fragmentation du karyosome. × 650.
- Fig. 7. Division nucléaire à la surface du sporonte; stade à fausses plaques équatoriales. × 2000.
- Fig. 8. Autre division à la surface du même sporonte. × 2000.
- Fig. 9. Divisions nucléaires à la surface du sporonte; stade à petites mitoses. × 2000.
- Fig. 10. Dernières divisions; stade à chromosomes et centrosomes. × 2000.
- Fig. 11. Stade de perlage à la surface du sporonte. × 1000.
- Fig. 12. Début de la formation des sporoblastes. × 1000.
- Fig. 13. Fin de l'individualisation des sporoblastes. × 1000.
- Fig. 14. Trois sporoblastes détachés, formation de la membrane et division. × 1200. Hématéine.
- Fig. 15. Spores mûres. × 1200. Hématéine.
- Fig. 16. Un individu en dégénérescence avec pycnose nucléaire. × 400.

Rhytidocystis opheliae HENNEGUY

(d'après les préparations de M^r HENNEGUY).

- Fig. 17. Jeune trophozoïte dans l'épithélium intestinal d'*Ophelia bicornis* SAVIGNY. × 650.
- Fig. 18. Spores mûres. × 1200.

Planche 12.

(Toutes les figures se rapportent à *Rh. henneguyi* et représentent des préparations par la méthode de MANN.)

- Fig. 19. Jeune trophozoïte sur le point de passer dans le sinus. × 650.
- Fig. 20. Jeune trophozoïte, montrant des grains distincts d'idiochromatine dans le noyau. × 650.
- Fig. 21 et 22. Noyaux de trophozoïtes adultes. × 650.
- Fig. 23 et 24. Etalement du noyau à la périphérie du sporonte et résolution du karyosome. × 650.
- Fig. 25. Sporoblastes individualisés à la surface d'un sporonte. × 1000.
- Fig. 26. Sporoblastes détachés et résidu de sporulation. × 1200.
- Fig. 27. Amas de leucocytes dégénérés autour d'un parasite résorbé dans l'épithélium. × 400.
- Fig. 28. Parasite en „dégénérescence claire“ dans le typhlosolis. × 300.

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

(Aus dem Pathologischen Institute der Kgl. Bayr. Tierärztlichen
Hochschule zu München.)

Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Übertragung.

I. Teil.

Von

Wilhelm Nöller, stud. med. vet.

(Hierzu Tafel 13—15 und 5 Textfiguren.)

Die Blutprotozoen des Wasserfrosches spielen in der Geschichte der Protozoologie eine große Rolle. Das gemeine Froschtrypanosoma, *Trypanosoma rotatorium* MAYER, ist vielleicht der zuerst entdeckte Vertreter der Gattung *Trypanosoma*, deren Arten heute wegen ihrer großen Bedeutung als Krankheitserreger ein so intensives Studium erfahren wie kaum eine andere Protozoengruppe. Ein Jahr früher (1841) sah VALENTIN im Blute der Bachforelle (*Trutta fario* L.) den ersten Blutparasiten aus der Klasse der Geißeltiere, doch ist es nach KEYSSELITZ fraglich, ob er ein *Trypanosoma* oder wahrscheinlicher ein *Trypanoplasma* gesehen hat. Doch forderte das Froschtrypanosoma das Interesse der Forscher viel mehr heraus als die erste Entdeckung VALENTIN'S, so daß bereits mehrere Arbeiten über das Froschtrypanosoma erschienen waren, ehe man das erste Säugetiertrypanosoma sah.

Auch die intrazellulären Blutprotozoen des Wasserfrosches nehmen eine geschichtliche Stellung ein. Schon 1850 beschrieb CHAUSSAT jenen Parasiten, der sich wie ein winziges Würmchen im

Froschblute fortbewegt, und nannte ihn *Anquillula minima*. Durch BÜTSCHLI, LANKESTER und GAULE wurde 1870 bis 1882 das Interesse der Forscher wieder auf diesen Parasiten gelenkt, den wir heute richtig *Lankesterella minima* nennen. Vielleicht ist auch der dritte Blutparasit des Wasserfrosches, das *Dactylosoma ranarum* KRUSE, schon vor der Entdeckung des Malariaparasiten gesehen, aber nicht von den GAULE'schen Würmchen oder „*Drepanidien*“ unterschieden worden, da ja die bewegliche Gametenform von *Dactylosoma* mit *Lankesterella* manche Ähnlichkeit besitzt.

Der Umstand, daß gerade beim Wasserfrosche die Blutparasiten aus dem Protozoenstamme so frühzeitig entdeckt worden sind, ist kein Zufall, da der Wasserfrosch früher das Lieblingsversuchstier der Zoologen, Anatomen und Physiologen war. Da aber trotz der geschichtlichen Stellung unsere Kenntnisse über die Wasserfroschblutparasiten gering geblieben sind, habe ich über sie weitere Untersuchungen angestellt, die ich im folgenden veröffentliche. Einen zweiten Teil gedenke ich folgen zu lassen, sobald ich die Lücken dieser Arbeit ausgefüllt habe.

Seit dem Sommer 1909 war ich in Thüringen bemüht, den Überträger des Froschtrypanosomas aufzufinden. Doch gelang es mir lange Zeit nicht, auf Fröschen blutsaugende Ectoparasiten zu finden. 1910 bis Juli 1912 setzte ich meine Untersuchungen in Berlin fort, ohne wesentliche Fortschritte in der Frage nach den Überträgern machen zu können. Erst gelegentlich meines Ferienaufenthaltes im August, September und Oktober 1912 in der väterlichen Fischzuchtanstalt Dörnfeld-Gräfnau a. d. Ilm (Thüringen) glückte es mir, wesentliche Befunde zu erheben. Das in Thüringen gesammelte Material habe ich im pathologischen Institute der Kgl. Bayr. Tierärztlichen Hochschule zu München, in dem ich durch die Güte des Herrn Prof. Dr. KITT einen Arbeitsplatz erhielt, fertig bearbeitet. Dort habe ich zahlreiche ergänzende Untersuchungen und alle Kulturversuche angestellt.

Färbetechnik.

Die morphologischen Angaben sind nur aus einwandfrei feucht fixierten und feucht weiterbehandelten Präparaten gewonnen worden. Die Fixierung geschah in konzentrierter Sublimatlösung oder in Sublimateisessig. Gefärbt wurde während meines Ferienaufenthaltes mit Hämalau und Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN. Da die Entwässerung der gefärbten Präparate in absolutem Alkohol unter

den ländlichen Verhältnissen schwierig und kostspielig ist, verwandte ich als Alkoholstufen Brennspritus (50 proz., 70 proz., 95 proz.), als nächste Stufe ein Gemisch von gleichen Teilen von 95 proz. Spiritus und Kreosot, dann reines Kreosot und als letzte Stufe Xylol. Läßt man die Deckglausstriche in jeder Stufe fünf Minuten verweilen, so liefert dieses Verfahren ganz die gleichen Ergebnisse wie Entwässerung mit absolutem Alkohol. Der Vorzug der Kreosotverwendung, die nach mündlichen Mitteilungen in der Hydrobiologie (Plön) gebräuchlich ist, liegt darin, daß Kreosot als offizinelles Präparat in jeder Apotheke einwandfrei zu haben ist und sich wegen der Sparsamkeit im Gebrauche viel billiger stellt als der absolute Alkohol.

Im Laboratorium des Pathologischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule zu München habe ich noch zahlreiche weitere Färbungsmethoden angewandt, vor allem DELAFIELD's Hämatoxylin, das Feucht-GIEMSA-Verfahren nach SCHUBERG und das Lithiumkarbonateisenhämatoxylin nach ROSENBUSCH mit der Modifikation, daß ich als Farblösung eine gereifte 1 proz. Hämatoxylinlösung in 10 proz. Alkohol benutzte (alte HEIDENHAIN-Lösung!), weil das alkoholunlösliche Lithiumkarbonat beim Eintröpfeln in die Lösung in 96 proz. Alkohol ausfällt.

Die Osmiumfixierung, wie sie besonders von MINCHIN für Trypanosomen empfohlen wird, zeigte der Sublimatfixierung gegenüber nur Nachteile in der Erhaltung der Kernstrukturen. Deshalb kam sie nur zur Anwendung, wenn es sich um die Fixierung von fettartigen Bestandteilen handelte, wie sie bei *Dactylosoma* vorkommen.

Die blutsaugenden Parasiten des Wasserfrosches.

Da ich erst lange Zeit trotz sorgfältiger Untersuchung zahlreicher Frösche niemals einen blutsaugenden Ectoparasiten fand, untersuchte ich bei mit Blutparasiten infizierten Wasserfröschen die in der Lunge schmarotzenden blutsaugenden Würmer. Doch ich habe niemals in dem Nematoden *Rhabdonema nigrovenosum* RUD. = *Angiostomum nigrovenosum* RUD. im Darminhalte lebende Froschblutparasiten gefunden. Bei den zahlreichen Lungentrematoden (Gattung *Pneumonoeces* u. a.) fand ich im Darme nie Trypanosomen, bei *Lankesterella*-Fröschen jedoch häufig lebende bewegliche *Lankesterella*-Exemplare, jedoch nur innerhalb des Darmlumens. Ein Lungentrematod (*Pneumonoeces*?) aus der Lunge eines *Dactylosoma*-Frosches zeigte nirgends *Dactylosoma*, obgleich er teilweise in Serienschnitten unter-

sucht wurde. Trematoden der Harnblase fehlten bei den infizierten Fröschen meist. Außerdem kommen ja die Trematoden wegen ihres komplizierten Entwicklungskreises schwerlich als Überträger eines Blutprotozoons in Betracht.

Bei der Suche nach Ectoparasiten richtete ich mein Augenmerk zunächst auf die Egel. *Hirudo medicinalis* L. kommt wegen seiner geographischen Verbreitung schwerlich als Überträger in Betracht, da er in Deutschland nur noch an wenigen Stellen in freier Natur vorkommt. Trotzdem machte ich mit Blutegeln zahlreiche Versuche. *Trypanosoma rotatorium* hält sich in seinem Magen, wie schon LABBÉ angibt, mehrere Tage am Leben, doch gelang es mir nicht, Vermehrung zu beobachten. Der Magen von *Hirudo* ist für Blutflagellaten kein Entwicklungsort, da ja alle untersuchten Egel flagellatenfrei sind. [Nur *Trypanoplasma* soll sich nach BRUMPT und KEYSSELTZ im Blutegel vermehren. Es dürfte aber fraglich sein, ob es sich nicht bloß um eine Lebenderhaltung dieser Flagellaten handelt.] Von *Dactylosoma* sind im Blutegelmagen noch am neunten Tage in den Erythrocyten abgerundete Schizonten und Merozoiten zu finden, auch sah ich noch einen lebenden beweglichen Gametocyten im Darms des Blutegels; doch habe ich vergeblich nach Stadien im Darmepithel gesucht. Auch *Lankesterella* hält sich im Blutegelmagen fünf Tage lang am Leben. Eine Weiterentwicklung habe ich jedoch nie beobachtet.

In einigen Arbeiten (LABBÉ 1894, HINTZE 1902) spielt der gemeine Pferdeegel (*Haemopsis sanguisuga* L. = *Aulastomum gulo* Moqu. TAND.) als vermutlicher Überträger von *Lankesterella* eine Rolle. LABBÉ und HINTZE halten diesen Egel für einen Blutsauger bei Fröschen. Mir ist es trotz zahlreicher Versuche niemals gelungen, selbst monatelang ausgehungerte Pferdeegel bei Fröschen zum Blutsaugen zu bewegen. Mehrfach habe ich zwar beobachtet, daß der Egel bei Fröschen anzubeißen versucht, einen Saugakt habe ich jedoch nie gesehen. Ich habe stets nur Aufnahme von Kleintieren (bes. Würmern) oder Aufnahme von Aas (tote Fische und Kröten) festgestellt. Bei toten Wirbeltieren frißt der Egel mit Vorliebe die Eingeweide, zu denen er gelangt, wenn die Leibeshöhle durch Fäulnis oder Verletzung eröffnet ist. Dieses Verhalten erklärt mir den gelegentlichen Befund von *Myxobolus*-Sporen im Magen und Darms des Egels und das Vorkommen CHARCOT-LEYDENscher Kristalle, das ich 1912 erwähnt habe. LABBÉ will nach 14 Tagen im Pferdeegel noch lebende *Lankesterella*-Exemplare beobachtet haben. Ich habe zahlreiche Pferdeegel untersucht, ohne je-

mals Froschblut oder *Lankesterella* im Darmkanale zu finden. Verfütterung von Pferdeegeln an nicht infizierte Wasserfrösche brachte niemals eine *Lankesterella*-Infektion hervor.

Trotz dieser negativen Befunde in bezug auf das Blutsaugen erscheint es nicht ausgeschlossen, daß der Pferdeegel sich in südlicheren Gegenden gelegentlich bei Wirbeltieren festbeißt, um Blut zu saugen. Vorausgesetzt, daß die Art richtig bestimmt ist, ist dieser Egel mehrfach in der Nasenhöhle des Pferdes gefunden worden, und LINGARD beschreibt in Indien sogar Trypanosomen aus seinem Darne. In unseren nördlicheren Gegenden ist Ähnliches bisher nicht beschrieben worden.

Der Rüsseegel *Hemiclepsis marginata* O. F. MÜLLER, der in den deutschen Gewässern viel weiter verbreitet und häufiger ist, als man allgemein annimmt, schien mir dann als der Überträger der Froschblutparasiten am ersten in Frage zu kommen. Er ist als Blutsauger bei Fischen und Amphibien bekannt, doch habe ich bis jetzt keine näheren Angaben über sein Blutsaugen bei Fröschen gefunden. Trotz sorgfältiger fortgesetzter Beobachtung gelang es mir lange nicht, den Egel auf Batrachiern beim Blutsaugen anzutreffen, ebensowenig wie es mir gelang, alte eingefangene Exemplare zum Anbeißen bei Fröschen zu bewegen. Erst bei einer Frühjahrsabfischung eines Teiches sah ich den Egel einmal vollgesogen auf einer Kröte. Bisher ist es mir im Sommer und Herbst nie gelungen, den Egel auf erwachsenen Fröschen anzutreffen, selbst in Teichen, in denen der Egel auf Karpfen, Schleien und Forellen nicht selten vorkam. Biologisch interessant waren mir die Beobachtungen gelegentlich der Abfischung in einem Teichreviere, dessen Teiche etwas verwildert waren. Die Frösche dieses Teichrevieres habe ich im Laufe des August 1911 und 1912 mehrfach auf Egel untersucht, doch vergebens. Bei der Abfischung Ende August fand ich ebenfalls auf erwachsenen Wasserfröschen keine *Hemiclepsis*. Auf Fischen (Forellen, Karpfen und Schleien) waren sie in mäßiger Anzahl aufzufinden. Auf den 5—7 cm langen, oft noch fußlosen Kaulquappen des Wasserfrosches fand ich sie jedoch auf fast jedem Exemplare in einer Anzahl von 1—6 Stück. Die Kaulquappen trugen meist junge oder doch kleinere Egel von 0,5—1,5 cm Länge, selten größere. Neben den festgehefteten Egel fanden sich noch *Hemiclepsis*-Mütter im Wasser freibeweglich, die ihre Embryonen oder ihre schon fertig entwickelten Jungen an der Bauchfläche trugen. [Die Angabe JOHANSSON'S in BRAUER, Die Süßwasserfauna Deutschlands, *Hemiclepsis* befestigte ihre Eierhaufen an Steinen und

anderen festen Gegenständen, bedecke sie mit ihrem Hinterkörper und Sorge durch wellige Bewegungen für die nötige Wasserwechslung, ist falsch.] Bemerkenswert bezüglich der Biologie der *Hemiclepsis* ist die Tatsache, daß sie mit Vorliebe auf Fischen und Kaulquappen Blut saugt. Auf erwachsenen Batrachiern habe ich sie, wie erwähnt, nur ein einziges Mal im zeitigen Frühjahr angetroffen. Es scheint, als ob dem Egel das Durchbohren der zäheren Haut der erwachsenen Amphibien Schwierigkeiten verursacht. Die feine und weiche Haut der Kaulquappen dagegen scheint er fast noch mehr zu bevorzugen als die der Fische. Daß die Wasserfrösche ebenso wie Fische *Hemiclepsis* gierig fressen, wenn sich Gelegenheit bietet, mußte ich bei meinen Versuchen mehrfach erfahren.

Ein weiterer Rüsselegel, der Kaulquappenblut saugt, ist der gemeine Fischegel, *Piscicola geometra* L. Ich beobachtete ihn beim Abfischen auf Kaulquappen und konnte ihn auch experimentell auf Kaulquappen des Wasserfrosches zum Blutsaugen bewegen. Zahlreiche Versuche jedoch, ihn bei ausgewachsenen Wasserfröschen zum Anbeißen zu bringen, sind bisher stets gescheitert, auch wenn ich ausgehungerte Egel benutzte.

Von Blut- oder Lymphesaugern aus dem Stamme der Arthropoden kommt für den Wasserfrosch und die Kaulquappe in unseren Gegenden nur eine Art in Betracht. Das ist die Karpfenlaus, *Argulus foliaceus* L. LABBÉ erwähnt 1894, daß er die Karpfenlaus häufig auf Fröschen gefunden habe. Ich habe sie auf Fröschen nicht gefunden, dagegen sehr häufig auf Kaulquappen, besonders von *Rana esculenta*. Bemerkenswert ist die Angabe LABBÉ's, daß (*Drepanidium* =) *Lankesterella* im Darne dieses Schmarotzers schnell verdaut wird. Ich habe bisher keine Untersuchungen mit Karpfenläusen angestellt. Zecken, die in wärmeren Gegenden auf Kröten gefunden wurden und wohl als Überträger von Krötenhämogregarinen in Betracht kommen (DURHAM 1902), habe ich auf dem Wasserfrosche nicht beobachtet. Auch sind mir über Vorkommen auf diesem Frosche keine Angaben bekannt geworden.

Von stechenden blutsaugenden Insekten beim Wasserfrosche ist mir nichts bekannt. Die Wasserwanzen *Nepa*, *Notonecta*, *Corixa*, u. a., die wohl gelegentlich einen Frosch angreifen und gern vom Wasserfrosche gefressen werden, kommen als Überträger schwerlich in Betracht.

Haltung der Frösche und Technik der Übertragungsversuche mit *Hemicleipsis*.

Die Wasserfrösche wurden in Gläsern gehalten, deren Boden 1—2 cm hoch mit Wasser bedeckt war. Das Wasser wurde täglich gewechselt. Bei der häufigen Blutentnahme ist es unbedingt nötig, die Frösche regelmäßig von Zeit zu Zeit mit Fliegen oder kleinen Wassertieren (Wasserwanzen, Kaulquappen u. a.) zu füttern. Die in das Maul gestopfte Nahrung wird meist willig abgeschluckt. Zur Blutentnahme versuchte ich zunächst Abschneiden einer Zehenspitze oder Anstechen der Arteria poplitea in der Kniekehle. Das erste Verfahren verstümmelt den Frosch bei häufiger Wiederholung und verursacht häufig Nekrose der Zehen. Das Anstechen der A. poplitea hat häufig starke Blutung in die subcutanen Lymphräume zur Folge. Außerdem liefern beide Verfahren das Blut stets mit Lymphe und mit Hautsekret verunreinigt, beides Beimengungen, die sofort ein Ausschlüpfen der beweglichen intrazellulären Blutparasiten verursachen. Besser bewährte sich das Anstechen der Vena facialis, die in dem Maulwinkel in der Rinne des Oberkiefers vor dem Kaumuskel sichtbar wird, um nach der Vena cutanea magna zu verlaufen. Den Wasserfrosch nehme ich in die linke Hand, öffne das Maul durch Abziehen des Unterkiefers und führe den Zeigefinger der linken Hand ins Maul ein, um ein Zuklappen des Maules zu verhindern. Dann steche ich mit feiner spitzer Nadel im oberen Maulwinkel in der Oberkieferfuge vor dem Kaumuskel in die Vene ein und sauge das sofort reichlich austretende Blut mit einer feinen Glaspipette auf, um es sogleich auf die Objektträger oder Deckgläser zu verteilen. Durch Herausziehen des Zeigefingers aus dem Maule des Frosches wird dieses geschlossen; der Unterkiefer klappt in die Fuge ein, in der die angestochene Vene liegt und die Blutung wird dadurch augenblicklich gestillt. Bei derartigem Vorgehen kann man die Blutentnahme ohne Schaden fast täglich wiederholen, wie es ja zur Durchführung monatelanger Beobachtungen unerlässlich ist.

Die Kaulquappen des Wasserfrosches wurden meist in Exemplaren von 4—8 cm Länge fußlos oder mit Hinterfüßen benutzt. Sie wurden in flachen, ca. 5 cm hoch mit Wasser gefüllten Schalen gehalten, deren Boden mit algenhaltigem Schlamm bedeckt war. Zur Durchlüftung wurden Wasserpestzweige eingesetzt. Die Wasserpflanzen wurden vorher mehrfach gewaschen und untersucht, um etwa ansitzende *Hemicleipsis*-Exemplare zu entfernen. Die Blut-

entnahme bei den Kaulquappen geschieht am einfachsten nach kurzem Abtrocknen mit einem trockenen Tuche durch Abschneiden der Schwanzspitze. Der hervorquellende Blutstropfen genügt zu einem Präparate. Leider verbluten sich viele Kaulquappen beim Zurücksetzen ins Wasser. Blutstillungsversuche durch Brennen geben nur unsichere Erfolge. Deshalb müssen die Versuche stets mit mehreren Kaulquappen zugleich vorgenommen werden.

Zu meinen Versuchen brauchte ich im ganzen ungefähr 20 *Hemiclepsis*-Mütter mit 4—500 Jungen. Deshalb konnte ich die Nahrungsaufnahme gut studieren. Zu den Infektionsversuchen wurden einige Egelmütter mit ihren fertig entwickelten Jungen in ein Glas mit wenig Wasser gesetzt. Sollten die Jungen an erwachsenen Wasserfröschen saugen, so wurden sie durch sanftes Abstreifen mit einer Pinzette von der Mutter losgelöst, und die Mütter wurden aus dem Glase entfernt, weil sie gern von den Fröschen gefressen werden. Da die jungen Egel meist tagelang nicht anbissen, schnitt ich den Fröschen einige Zehenspitzen ab, um schwache Blutungen zu erzeugen. Der Erfolg war gut. Innerhalb von 6—12 Stunden hatten sich dann stets mehrere, selten jedoch viele Egel vollgesogen, und zwar meist an oder in der Nähe der blutenden Stelle.

Bei Kaulquappen sind derartige Kniffe nicht nötig. Sobald man eine Kaulquappe in das Glas zu den Egeln gesetzt hat, wird sie, sobald sie durch ihren Ruderschwanz das Wasser in Bewegung setzt, sofort von jungen Egel besät, die den Saugakt meist sogleich beginnen. Sobald sich genügend Egel auf der Kaulquappe angesetzt haben, wird sie aus dem Egelglase entfernt und in eine Schale mit Wasser gesetzt. Andernfalls würden häufig Egel, die wenig Blut aufgenommen haben und deshalb noch nicht durch Rotfärbung des Magens gekennzeichnet sind, unter den nicht infizierten Egel des Vorratsglases zurückbleiben und Ursache zu Versuchsfehlern abgeben. Der Saugakt der nüchternen jungen Egel dauert eine halbe bis drei Stunden. Meist wird reines Blut aufgenommen, und die Egel sind dann durch die pralle Füllung und Rotfärbung des Magens leicht kenntlich. Bei Fütterung an Kaulquappen ist das Blut aber manchmal so stark mit Lymphe vermischt oder in so geringer Menge aufgenommen worden, daß die Unterscheidung von nüchternen Egel nur durch Betrachtung mit schwachen Systemen (Zeiß A, Leitz 3) möglich ist. Die Aufnahme reiner Lymphe, wie es ROBERTSON bei Fütterung auf Fischen beschreibt, kommt bei Fütterung an erwachsenen Fröschen nicht selten vor. Die zweite Blutaufnahme geschieht meist nach 10—14 Tagen. Unter 10 Tagen beißen nur Exemplare an,

die das erste Mal nur wenig Blut aufgenommen haben. Gut voll-gesogene Egel brauchen manchmal über drei Wochen zur Verdauung der ersten Blutmahlzeit. Die dritte Blutaufnahme findet 14—28 Tage oder noch länger nach der zweiten statt.

Die durchschnittlichen Maße der jungen Egel fand ich wie folgt:

Länge vor dem ersten Saugakte	(3—)4— 7 mm,
Länge nach dem ersten Saugakte	6— 8 mm,
Länge nach dem zweiten Saugakte	12—14 mm.

Die infizierten Egel wurden in zusammengehörigen Gruppen in Gläsern mit Wasser und einigen Wasserpestzweigen aufbewahrt. Da die Witterung während der Versuche außerordentlich kühl war, wurden Gläser in einem Raume aufgestellt, dessen Tagestemperatur 14—25° C. betrug.

I.

Trypanosoma rotatorium MAYER 1843.

Geschichte.

Die älteren Arbeiten über das *Trypanosoma rotatorium* sind bei LAVERAN et MESNIL, Trypanosomes et Trypanosomiasis, Paris 1904 und bei FRANÇA, C. et ATHIAS, M. (1906): Les Trypanosomes de *Rana esculenta* in Archivos do R. Instituto Bact. Camara Pestana Bd. 1 zusammengestellt. Deshalb gehe ich nur auf die neueren Arbeiten ein.

Im Kaulquappenblute ist das *Trypanosoma* selten gesehen worden, so von DANILEWSKY (1886), KRUSE (1890) einmal und LEBEDEFF einmal (1910). KONINSKI (1901) und FINKELSTEIN (1908) konnten in Forschlarven keine Trypanosomen finden. Übertragungsversuche stellte 1904 BILLET mit *Helobdella algira* an, doch ohne Erfolg. Während es ihm in Algier gelang, das kleine *Tryp. inopinatum* SERGENT in diesem Egel zur Entwicklung zu bringen, stellt er fest, daß sich das *Trypanosoma rotatorium* des Wasserfrosches in *Helobdella* nicht entwickelt. FRANÇA dagegen will 1908 in Portugal das *Tryp. rotatorium* (*T. „costatum“* und „*rotatorium*“) von Frosch zu Frosch übertragen haben. Seine Versuche sind aber ohne die nötigen Vorsichtsmaßregeln angestellt worden und deshalb, was *T. rotatorium* anlangt, gar nicht überzeugend. Seine angeblichen Neuinfektionen lassen sich ebensogut als Rezidive deuten. PATTON berichtet 1908,

daß er in einer *Clepsina* (*spec.?*) von *Rana tigrina*, die mit *Trypanosoma rotatorium* und *T. hendersoni* (= *inopinatum*) infiziert war, regelmäßig *Crithidia*-ähnliche Flagellaten gefunden habe, daß es ihm jedoch nie gelungen sei, durch solche Egel Frösche mit Trypanosomen zu infizieren.

Bezüglich des Vorkommens der Trypanosomen in den inneren Organen der Frösche macht BERESTNEFF 1903 auf die auffällige Häufigkeit im Nierenblute aufmerksam.

LEBEDEFF veröffentlicht 1910 seine ausführliche Arbeit über das *Tryp. rotatorium*, das er sowohl morphologisch wie experimentell nach verschiedenen Richtungen hin untersucht hat. Er unterscheidet einige Haupttypen, die FRANÇA und ATHIAS als eigene Arten getrennt hatten, untersucht sie genau cytologisch und betont ihren Zusammenhang. Er gibt an, daß bei „akuter“ Infektion, die er zweimal bei Grasfröschen fand, eine Übertragung von Frosch zu Frosch gelinge, doch sind seine Versuche nicht beweisend, da in beiden Fällen eine Mischinfektion mit dem froschpathogenen *Bacillus hydrophilus fuscus* vorlag, dem die gespritzten Frösche nach wenigen Tagen erlagen. Durch Infektion von Kulturformen konnte LEBEDEFF bei vorher trypanosomenfreien Fröschen eine Infektion hervorrufen. Aus den Kulturen beschreibt er kernlose, „chromidiale“ Formen, was wohl auf mangelhafte Technik zurückzuführen ist. Daß die Injektion von Froschblut mit Trypanosomen im „chronischen“ Verlaufe der Infektion weder bei Fröschen oder Kröten noch bei Kaulquappen eine Infektion hervorbringt, hat LEBEDEFF durch zahlreiche Versuche gezeigt. Neuerdings (1911) hat MACHADO das *Tryp. rotatorium* in Brasilien aus *Leptodactylus ocellatus* genau cytologisch untersucht. Bemerkenswert sind seine Angaben über das Vorkommen einer echten multiplen Teilung im geißellosen Zustande, die im Blute und in den inneren Organen der Frösche aufzufinden ist. Ich habe diese Vermehrungsweise bisher im Froschblute noch nicht gefunden. Die geschichtliche Darstellung der Kulturversuche an dem gemeinen Froschtrypanosoma folgt in einem späteren Abschnitte.

Die Übertragung des Froschtrypanosomas.

Nachdem es mir trotz jahrelanger Beobachtung nicht gelungen war, auf erwachsenen Wasserfröschen blutsaugende Egel aufzufinden, begann ich eine natürliche Übertragung der Trypanosomen schon im Kaulquappenstadium anzunehmen, da ich auf Kaulquappen schon Fischegel gesehen hatte und bei ganz jungen Fröschen auch häufig

starke Trypanosomeninfektion fand. Die sehr spärlichen Angaben über das Vorkommen von Trypanosomen bei Kaulquappen des Wasserfrosches beschränken sich auf die bloße Angabe einer einzelnen Beobachtung (DANILEWSKY 1886, KRUSE 1890, LEBEDEFF 1910). Eine Beschreibung der in Kaulquappen gesehenen Trypanosomen geben diese Forscher nicht. Daß sehr junge Frösche schon infiziert sein können, ist dagegen häufiger hervorgehoben worden. MACHADO gibt (1911) sogar an, daß bei den jungen Fröschen (*Leptodactylus ocellatus*) ein besonderer Typus der Trypanosomen vorherrscht, nämlich schlanke Tiere mit zugespitztem Hinterende, deutlich rundlichem Kerne mit kompakten Caryosome, stark gewundener undulierender Membran und freiem Geißelende; er hält diese Trypanosomen, von denen er sehr gute Abbildungen gibt, für männliche und weibliche Geschlechter je nach der Größe des Caryosoms.

Bei der Untersuchung des Blutes zahlreicher fußloser Wasserfrosch-Kaulquappen und von Exemplaren, die das hintere Beinpaar schon zeigten, hatte ich zunächst nur Mißerfolge, weil ich die Präparate nur mit starken Trockensystemen oder mit Immersion betrachtete, ein Verfahren, das infolge des geringen Gesichtsfeldes stets da im Stiche läßt, wo nur spärliche Trypanosomen vorhanden sind. Als ich darauf begann, die Präparate durch Seitwärtsschieben der Irisblende und entsprechende Spiegelstellung schief zu beleuchten und bei dieser einfachen Dunkelfeldbeleuchtung mit schwacher (50 \times) Vergrößerung genau durchzumustern, änderte sich die Lage sofort. Da die Trypanosomen sehr lebhaft beweglich sind, sind sie bei dieser Beobachtungsweise sehr leicht aufzufinden, selbst wenn sich, wie es häufig der Fall ist, nur ein oder wenige Exemplare im Präparate befinden. In einem *Hemiclepsis*-armen Teichreviere waren 5–10 Proz. der Kaulquappen von *Rana esculenta* mit Trypanosomen infiziert; aus einem egelreichen Teiche dagegen zeigten 50•Proz aller Wasserfroschlarven spärliche Trypanosomen im Blute. Ob das sehr spärliche Vorkommen der Trypanosomen bei den infizierten Kaulquappen die Regel ist oder durch die außergewöhnlich kalte Witterung des August und September 1912 bedingt war, kann ich noch nicht feststellen.

Morphologie der bei den Kaulquappen gefundenen Trypanosomen.

Die Trypanosomen aus dem Kaulquappenblute zeichnen sich durch lebhaft Bewegungen und Verbiegungen ihres Körpers aus. Sonst zeigen sie eine große Übereinstimmung in ihrer Form. Ihre Haupt-

merkmale sind scharf zugespitztes Hinterende, schlanker langer schlangenanartiger Protoplasmakörper, um den sich die kräftige undulierende Membran herumschlängelt. Das freie Geißelende besitzt eine beträchtliche Länge. Der Blepharoplast ist klein und liegt in der Nähe des Hinterendes. Der Kern ist rund (höchstens schwach oval) und zeigt innerhalb der hellen Kernsaftzone das kompakte, stark färbare Caryosom, in dem sich weitere Einzelheiten nicht nachweisen lassen. Die Länge des Körpers beträgt 25—30 μ , sein Durchmesser 2—3 μ . Der in der Körpermitte gelegene Kern mißt 2—2.8 μ im Durchmesser, das Caryosom 1—2 μ . Das freie Geißelende ist 12—15 μ lang. Aus dem schlankeren oder breiteren Körper und der etwas schwankenden Größe des Caryosoms heraus die Exemplare als Männchen oder Weibchen ansprechen zu wollen, ist ganz verfehlt, da die Abweichungen zu gering bleiben und sich alle Übergänge vorfinden (Tafel 13, Fig. 1—2).

Übertragungsversuche von Kaulquappe zu Kaulquappe.

Da ich beim Abfischen des Teiches, in dem 50 Proz. aller untersuchten Kaulquappen die Trypanosomen im Blute zeigten, auf fast jeder Kaulquappe ein oder mehrere *Hemiclepsis*-Exemplare fand, untersuchte ich deren Mageninhalt und fand sowohl lebende typische Kaulquappentrypanosomen unmittelbar nach der Blutaufnahme, späterhin crithidienförmige und trypanosomenartige Entwicklungsformen. Daraus ergab sich schon mit allergrößter Wahrscheinlichkeit, daß *Hemiclepsis marginata* der Überträger der Kaulquappentrypanosomen ist. Vorsichtig angestellte Versuche sollten das bestätigen.

Einige Kaulquappen wurden genau auf das Vorhandensein von Trypanosomen geprüft (Blutentnahme durch Abschneiden der Ruderschwanzspitze; Betrachtung im Dunkelfelde) und trypanosomenfrei befunden. Vor zehn und mehr Tagen von infizierten Kaulquappen abgelesene junge *Hemiclepsis*-Exemplare zeigten bei Betrachtung mit Trockensystem 7 schon Trypanosomen in der Rüsselscheide. Auf die nicht infizierte Kaulquappe 1 wurden am 6. IX. 12 sechs von diesen Egel, auf die Kaulquappe 2 am 9. IX. 12 vier Egel aufgesetzt und nach dem Saugakte, der 2—3 Stunden dauerte, entfernt. Die selbstverständlich isoliert in einzelnen Wasserschalen gehaltenen Kaulquappen zeigten bei der nächsten Blutuntersuchung, die am 15. IX. 12 in ganz der gleichen Weise vorgenommen wurde, beide spärlich typische Kaulquappentrypanosomen im Blute, bei Kaulquappe 2, die erst vor sechs Tagen von den Egel gebissen

worden war, fielen manche Trypanosomen durch ihre Kleinheit auf. Ein dritter Übertragungsversuch fiel negativ aus. Die geglückten Versuche hatten gezeigt, daß *Hemiclepsis* das Kaulquappentrypanosoma von Kaulquappe zu Kaulquappe durch den Saugakt überträgt.

Weitere Versuche wurden mit jungen Egelⁿ angestellt, die erst durch Saugen an infizierten Kaulquappen infiziert wurden. Eine Trypanosomen-Infektion junger *Hemiclepsis*-Exemplare, die noch kein Blut aufgenommen hatten, habe ich ebensowenig beobachtet wie BRUMPT und ROBERTSON, obgleich ich zahlreiche nüchterne wie auch vor mehreren Tagen mit Blut nicht infizierter Kaulquappen oder Frösche gefütterte junge Egel untersucht habe. Junge Egel, die vor 14 Tagen an einer infizierten Kaulquappe Blut gesogen hatten und seit einem Tage Trypanosomen in der Rüsselscheide zeigten, wurden zu je 3—4 auf drei nicht infizierten Kaulquappen am 16. IX. 12 gesetzt und nach dem Saugakte entfernt. Bei der Blutuntersuchung am 24. IX. 12 zeigten zwei von diesen Kaulquappen Trypanosomen im Blute. Das Blut von drei weiteren Kaulquappen wurde dadurch geprüft, daß einige junge Egel am 16. IX. 12 aufgesetzt und vier Tage nach dem Saugakte (20. IX.) zerzupft und untersucht wurden. Keiner der Egel zeigte Entwicklungsformen von Trypanosomen im Magen (beim Saugen an infizierten Kaulquappen sind nach vier Tagen schon stets reichliche Mengen von Flagellaten vorhanden). Auf den so geprüften nicht infizierten Kaulquappen ließ ich am 20. IX. 12 je 4—6 junge Egel saugen, die vor 18 Tagen zum ersten Male das Blut einer infizierten Kaulquappe aufgenommen hatten und seit 4—5 Tagen Trypanosomen in der Rüsselscheide zeigten. Zwei Kaulquappen starben; die dritte zeigte am 28. IX. 12 Trypanosomen im Blute.

Die Inkubationszeit bei den Kaulquappen dauerte fünf bis sechs Tage. Die zuerst erscheinenden sehr spärlichen Trypanosomen zeichneten sich durch Kleinheit und sehr schmalen Körper aus. Doch schon neun bis zehn Tage nach dem Egelbisse, zur Zeit des Höhepunktes der Infektion, zeigen alle Kaulquappentrypanosomen ihre typische Gestalt und gleichmäßige Größe. Ihre Zahl war auch dann nicht groß. Auf ein Deckglaspräparat 18×18 mm kamen ungefähr 20 Trypanosomen. Diese Seltenheit der Trypanosomen bei meinen Versuchen machte es mir unmöglich, die Teilung zu verfolgen, die aber aller Wahrscheinlichkeit nach eine gewöhnliche Zweiteilung darstellen dürfte. In Ausstrichen aus inneren Organen der Kaulquappen fand ich bisher nur freie Trypanosomen, niemals intrazelluläre oder multiple Teilungsformen.

Auch beim Studium der Entwicklung im Magen der *Hemiclepsis* trat mir das spärliche Vorkommen der Trypanosomen im Kaulquappenblute hemmend entgegen, so daß ich trotz eifrigstem Suchen in zahlreichen jungen Egeln die ersten Teilungen nach der Blutaufnahme nicht finden konnte; es ist deshalb sowohl Teilung im geißeltragenden Zustande (wie es bei den Trypanosomen der Süßwasserfische im Egel geschieht) oder mehrmalige Teilung der abgekugelten Formen nach Verlust der Geißel in Betracht zu ziehen, wie es für die Trypanosomen mehrerer Meeresfische von BRUMPT und ROBERTSON beschrieben worden ist. Letztere Möglichkeit ist nicht ganz von der Hand zu weisen, da sich die dicken Formen von *Trypanosoma rotatorium* in künstlicher Kultur zunächst in ähnlicher Weise vermehren, wie ich noch beschreiben werde. Nach zwei bis drei Tagen sind im Egel zunächst nur spärliche kleine *Leptomonas*-artig gebaute Flagellaten vorhanden, die vom vierten Tage ab durch schnelle Vermehrung schmale und schlanke Crithidien liefern. Nach Wochenfrist treten schlanke Trypanosomen auf, die allmählich überwiegen und gegen Ende der ersten Verdauungsperiode (gewöhnlich nach 10 bis 14 Tagen) in die bis dahin freie Rüsselscheide einwandern; dort nimmt ihre Zahl bedeutend zu. Die Infektion geschieht durch diese Rüsselscheidetrypanosomen, wie schon BRUMPT und ROBERTSON gezeigt haben, durch Einpressen in die Bißwunde. Nach einem Saugakte ist die Rüsselscheide rein; im Magen beginnt die Entwicklung wieder in gleicher Weise. Ein Übertreten der Trypanosomen in den Darm des Egels findet nie statt (während es beim *Trypanosoma inopinatum* SERGENT in *Helobdella* die Regel bildet). Ebenso wenig habe ich jemals Trypanosomen in der Magenwand oder im Cölom der experimentell infizierten jungen *Hemiclepsis*-Exemplare gefunden. Lange Hungerperioden vermindern bei jungen Egeln wohl die Zahl der Trypanosomen, können die Infektion aber nicht zum Verschwinden bringen, ebensowenig wie Kältegrade bis zum Nullpunkte herab. Erstaunlich ist die Leichtigkeit, mit der sich die jungen Egel selbst beim Saugen an Kaulquappen infizieren, in deren Blute die Trypanosomen mikroskopisch nur sehr spärlich nachweisbar sind. Von über hundert jungen Egeln haben sich alle infiziert, obgleich manche nur verhältnismäßig wenig infiziertes Kaulquappenblut aufnahmen. Um so überraschender war das Ergebnis bei den jungen Egeln, die an einem gut mit *Trypanosoma rotatorium* infizierten erwachsenen Wasserfrosche Blut saugen. Der Frosch zeigte sowohl die dicke gestreifte Form wie auch die schmale glatte Varietät mit langer freier Geißel und Zwischenformen im Blute.

Vom 8. bis 13. IX. 12 sogen sich an dem Frosche insgesamt 26 nüchterne, junge Egel voll, die in ganz gleicher Weise bei derselben Temperatur (+ 10 bis + 20° C) aufbewahrt wurden wie die Egel, die an den infizierten Kaulquappen Blut aufgenommen hatten. In Abständen wurden diese Egel nacheinander vom 4. bis zum 30. Tage zerzupft und untersucht. Kein einziger zeigte Crithidien oder Trypanosomen in seinem Magen oder in der Rüsselscheide. Die Verdauung war bei diesen Egel weniger fortgeschritten als bei denen, die Kaulquappenblut gesogen hatten.¹⁾

Drei sorgfältig untersuchten und trypanosomenfrei befundenen Wasserfröschen wurde das Blut zweier infizierter Kaulquappen intraperitoneal und in den Bauchlymphsack eingespritzt am 1. X. 12. Drei ebenfalls trypanosomenfrei befundene Wasserfrösche dienten als Kontrolltiere. Bei der Untersuchung am 14. X. 12 zeigten zwei der gespritzten Frösche vorwiegend die dicke gestreifte Form des Froschtrypanosomas im Blute, das Gleiche war bei einem der drei Kontrollfrösche der Fall, so daß diese Ergebnisse sicher als durch den Temperaturwechsel (die Frösche wurden während der Versuchsdauer im warmen Zimmer gehalten) hervorgerufene Rezidive angesprochen werden müssen, und das um so mehr, als sich keinerlei Übergangsformen fanden.

Das Ergebnis, daß sich die Kaulquappentrypanosomen in jungen *Hemicleipsis*-Exemplaren entwickeln und von *Hemicleipsis* leicht von Kaulquappe zu Kaulquappe übertragen werden, während sich die gewöhnlich im Blute der erwachsenen Wasserfrösche vorkommenden Trypanosomenformen im Egel nicht entwickeln, ist von Bedeutung. Man könnte zunächst vermuten, es handele sich um zwei verschiedene Trypanosomenarten. Dagegen spricht vielerlei: 1. Sehr junge Frösche sind meist schon mit *Trypanosoma rotatorium* infiziert (LAVERAN und MESNIL, LEBEDEFF, MACHADO, Verfasser u. a.). 2. Die von MACHADO bei jungen Fröschen (*Leptodactylus*) beschriebenen Trypanosomen („Geschlechtstiere“) gleichen den von mir bei den Kaulquappen des Wasserfrosches beobachteten Trypanosomen in allen Hauptmerkmalen. 3. Es gelang mir, eine am 16. IX. 12 eingefangene mit typischen Kaulquappentrypanosomen infizierte Wasserfroschkaulquappe zu einem kleinen Fröschchen zu erziehen, dessen Schwanzstummel am 15. X. 12 nur noch 1 cm, am 31. X. 12 nur noch 0,5 cm lang war. Am

¹⁾ Anmerk. bei der Durchsicht:

Diese Versuche sind inzwischen mit erwachsenen Egel wiederholt worden. Auch hier starben die Trypanosomen des erwachsenen Frosches (dicke, gestreifte Varietät) nach einigen Tagen im Egelmagen ab und wurden verdaut.

31. X. 12 verendete das Fröschen. In seinem Blute zeigten sich typische Kaulquappentrypanosomen. Dieser Versuch zeigt, daß die Kaulquappentrypanosomen im Blute junger Frösche vorkommen können. 4. In den Teichen, in denen die Kaulquappen mit ihren Trypanosomen (bis zu 50 Proz.) infiziert waren, habe ich bei den erwachsenen Fröschen stets nur die bekannten Formen des *Trypanosoma rotatorium* gefunden. 5. *Hemiclepsis* saugt an erwachsenen Fröschen nur ungern Blut. 6. In dem einzigen Blutsauger, der außer *Hemiclepsis* in jenen Teichen Frösche und Kaulquappen angreift, nämlich in *Argulus foliaceus* L., der Karpfenlaus, habe ich eben so wenig wie KEYSSELITZ Flagellaten auffinden können. Daraus ergeben sich mit aller Wahrscheinlichkeit folgende Schlüsse: Das *Trypanosoma rotatorium* wird durch *Hemiclepsis* von Kaulquappe zu Kaulquappe übertragen. Die bei den erwachsenen Wasserfröschen vorkommenden Formen dieses Trypanosomas stammen von einer im Larvenstadium erworbenen Infektion her. Ihre vom Kaulquappentrypanosoma abweichenden Formen sind bedingt durch die Änderungen der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Blutes, die beim Übergange von der Kiemenatmung zur Luftatmung, vom Wasserleben zum Leben auf dem Lande stattgefunden haben. Die Vermehrungsfähigkeit der Trypanosomenformen der erwachsenen Wasserfrösche im Überträger *Hemiclepsis marginata* ist (vermindert worden oder) verloren gegangen.

Weitere Versuche des Identitätsbeweises für die Kaulquappentrypanosomen und *Tryp. rotatorium* werden, sobald sich Kaulquappen beschaffen lassen, in Aussicht genommen 1. durch Einspritzen kultivierter Wasserfroschtrypanosomen in nicht infizierte Kaulquappen, 2. durch Erziehen von infizierten Kaulquappen zu erwachsenen Fröschen. Auch soll die Übertragung der Kaulquappentrypanosomen durch *Hemiclepsis* auf Kaulquappen von *Rana temporaria*, *Bufo spec.* und *Pelobates spec.* geprüft werden.

Einige Versuche, die Trypanosomen durch junge, experimentell infizierte Egel auf Goldfische zu übertragen, sind ergebnislos geblieben, da die Versuchsfische schon drei Tage nach dem Ansetzen der Egel verendeten, ohne Trypanosomen zu zeigen.

Übertragungsversuche bei Kaulquappentrypanosomen mit *Piscicola geometra* L. sind noch nicht ausgeführt worden. Wahrscheinlich ist auch dieser Egel fähig, das Trypanosoma zu übertragen.

Morphologie der Trypanosomen im Wasserfrosche.

Bei der sehr verschiedenen Gestalt und Größe, die die Formen des Froschtrypanosomas im Blute zeigen, sei hier eine kurze Übersicht über die Bezeichnungen gegeben:

1. Schlanke Trypanosomen mit schmalen Körper, stark entwickelter undulierender Membran, rundem Kerne mit kompaktem rundem Caryosome, schnabelförmig zugespitztem Hinterende und freie endender Geißel.

2. Große kompakte, längliche, ovale oder runde, sehr protoplasmareiche Formen mit gestreiftem Periplaste. Kern rund, blasenförmig, mit rundem großem Caryosome. Blepharoplast in der Nähe des Kernes, der meist in der Körpermitte nahe der Oberfläche liegt. Die undulierende Membran verläuft vom Blepharoplaste zu dem oft abgerundeten Hinterende und ist mäßig stark entwickelt. Das freie Ende der Saumgeißel ist kurz oder fehlt.

3. Glatte, meist ungestreifte Formen mit breitem Hinterende. Körper dünn, flach. Undulierende Membran außerordentlich stark entwickelt, von dem breiteren Hinterende bis zu dem in der Regel schmaleren Vorderende hin verlaufend. Freies Saumgeißelende sehr lang. Der Kern ist langgestreckt und zeigt an seinen Polen je eine kappenartige Chromatinanhäufung, von denen die eine dem Blepharoplasten zugekehrt ist, während die zweite in oder vor der Mitte des Tieres liegt.

FRANÇA und
ATHIAS.

—

„*Tryp. costatum*“ ohne freies Geißelende.
„*T. loricaum*“ mit freiem Geißelende.

„*Tryp. rotatorium*“
sensu stricto.

LEBEDEFF

—

Kammartige oder „sterile“ Form.

„Gewöhnliche“, Geißeltragende Form.

MACHADO

Geschlechtstiere.

Große runde geschlechtliche Formen.

Ungeschlechtliche breite Form.

Zwischen diesen Haupttypen sind alle Übergänge vorhanden, so daß ich ebenso wie LEBEDEFF und MACHADO FRANÇA's und ATHIAS' Einteilung in mehrere Arten nicht billigen kann.

1. Kaulquappentrypanosomen und die den Kaulquappentrypanosomen in allen wesentlichen Merkmalen gleichenden schlanken Trypanosomen, die MACHADO in jungen Fröschen fand, gleichen am meisten den Trypanosomen anderer Tiere. Sie treten im Anfange der Infektion bei Kaulquappen und bei jungen Fröschen auf und sind als die echte Trypanosomenform des Froschtrypanosomas aufzufassen, während die anderen Formen bei den erwachsenen Fröschen als veränderte Überbleibsel einer sehr weit zurückliegenden Infektion aufzufassen sind, die durch die veränderten Lebensbedingungen sich mehr oder weniger von der Trypanosomenform, wie wir sie bei den meisten Arten beobachten, entfernt haben.

2. Die große dicke Riesenform ist vor allem von LEBEDEFF in allen morphologischen Merkmalen richtig beschrieben worden. Auch FRANÇA und ATHIAS haben aus Trockenpräparaten den Kern schon als Bläschenkern (Fig. 10) erkannt, dessen großes rundes Caryosom in mehreren ihrer Figuren gut wiedergegeben ist. Diese mit den Kaulquappentrypanosomen gemeinsame Kernstruktur veranlaßt mich, diese Form jenen anzunähern. Sie ist als Riesenform aufzufassen, die außer in Größenwachstum und Protoplasmamenge den ursprünglichen Formen in Kernstruktur und Geißelbau gleicht. Bemerkenswert ist auch, daß sie in der Infektionsfolge der breiten, glatten Form vorausgeht (MACHADO). Auf die Unrichtigkeit der Bezeichnung LEBEDEFF's als „sterile“ Formen gehe ich bei Betrachtung ihrer Teilungsfähigkeit ein.

3. Die Form mit langgestrecktem spindelförmigem Kerne bietet infolge ihrer Kernstruktur das größte Interesse. Zwar haben schon frühere Arbeiten nach GIEMSA-Präparaten gelegentlich Formen mit langgestrecktem Kerne beobachtet. Doch erst LEBEDEFF ist es nach feucht fixierten und mit HEIDENHAIN's Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten gelungen, die Einzelheiten der Kernstruktur aufzudecken. Meine Ergebnisse aus Präparaten sowohl vom Wasserfrosche wie vom Laubfrosche (Fig. 8 und 9) bestätigen LEBEDEFF's Angaben hierüber in allen wesentlichen Punkten. Es erfordert allerdings viele Mühe, gute Präparate von diesen Strukturen zu erhalten. Der langgestreckte („polarisierte“) Kern liegt in der vorderen Hälfte oder in der Mitte des Körpers und zeigt ein Ende stets dem Blepharoplaste zugekehrt. Die beiden Pole des Kernes werden meist durch kappenartige, zugespitzte Chromatin-

haufen gebildet, zwischen denen ein hellerer Verbindungsstreifen liegt, der aus achromatischer Substanz besteht und nur selten Einlagerungen von kleineren oder größeren Chromatinbrocken enthält. Eine Kernsaftzone ist meist nicht wahrzunehmen, oft verläuft ein feines fibrillenartiges Gebilde von der vorderen Chromatinkappe zum Blepharoplasten. Der ganze Kern bekommt so das Aussehen eines sich mitotisch teilenden Caryosoms, dessen Tochterplatten schon weit auseinandergewichen sind. Doch bin ich mit LEBEDEFF darin einig, daß diese Struktur keine Kernteilungsform darstellt, weil sich bei manchen Fröschen wochenlang nur solche Trypanosomen vorfinden, ohne daß jemals im Blute oder in den inneren Organen eine Zweiteilung stattfindet. Die Andeutungen einer weitergehenden Zweiteilung, wie sie LEBEDEFF und MACHADO gesehen haben wollen, sind aus ihren dafür gegebenen Figuren (MACHADO Fig. 24, 25, 26; LEBEDEFF Fig. 59—64) nicht zu entnehmen. Daß bei manchen Trypanosomen dieser Form nur die Hälfte der spindelartigen Figur vorhanden ist, ist deshalb kein Beweis für eine vorhergegangene Teilung, weil sich diese Form auch als Anpassungserscheinung an eine dünne Zelle erklären läßt. Die „indifferenten“ Formen LEBEDEFF's halte ich für nichts anderes als für unregelmäßig gestaltete Exemplare dieser Form, ebenfalls die „chromidialen“ Formen, deren Chromidien sicher nichts anderes darstellen als Degenerationsprodukte oder Körner von Reservestoffen. Über das Vorkommen der Form mit langgestrecktem Kerne geben LEBEDEFF und MACHADO übereinstimmend an, daß sie sich bei „alten, chronischen“ Infektionen vorfindet. Ich kann bestätigen, daß sie bei lange gefangengehaltenen Fröschen vorkommt, die naturgemäß in der Gefangenschaft schlechter genährt werden. Die unregelmäßige „indifferente“ Form mit ebenfalls länglichem Kerne sah LEBEDEFF vor allem in zwei Fällen einer Mischinfektion mit einem froschpathogenen Bazillus und glaubt, daß jene Fälle wegen der Häufigkeit der Trypanosomen als akute Infektionen zu bezeichnen seien. Ich halte diese Häufigkeit für eine rezidivartige Vermehrung infolge der Infektion.

Nach Klarstellung dieser Punkte bin ich geneigt, die protoplasmaarme Form mit dem mehr oder weniger regelmäßig langgestreckten Kerne als Hungerform aufzufassen, die unter ungünstigen Verhältnissen auftritt und deren langgestreckte oder unregelmäßige Kerngestalt durch die Schmalheit, ja durch die manchmal fast blattartige Form der Zelle bedingt ist.

Bemerkenswert bleibt, daß ich ebenso wie FRANÇA im Blute von spontan oder künstlich infizierten Laubfröschen nur diese Form fand.

Kultur der Froschtrypanosomen. Geschichtliches.

Die ersten Versuche, das Froschtrypanosoma zu kultivieren, rühren von DANILEWSKY und seinem Schüler SCHALASCHNIKOFF her. Ihnen gelang es, die große, dicke Form außerhalb des Froschkörpers zur Vermehrung zu bringen, die sie unter dem Mikroskope beobachteten. Leider sind mir die Originalangaben dieser Forscher nicht zugänglich gewesen, so daß ich ihre Ergebnisse nach Referaten (FRANÇA, LEBEDEFF, MACHADO) anführen muß. Die großen dicken Trypanosomen sollen sich durch „Segmentierung“ in kleine Flagellaten geteilt haben, deren Zahl bis auf 120 angegeben wird. Nach FRANÇA sollen sich über die von DANILEWSKY angewandte Technik keine Angaben vorfinden. Jedenfalls aber hat DANILEWSKY diese Teilungsvorgänge in feinen Glaskapillaren beobachtet, da er in den Archives slaves de Biologie Bd. 1 (Paris 1886) die Methode der Kapillarenkultur für solche Zwecke warm empfiehlt. 1905 gelang es LEWIS und WILLIAMS, die Frosch- und Krötentrypanosomen im mit mehreren Tropfen Blut beimpften Kondenswasser von Nähragar zu züchten. BOUET erlangte 1906 gut bewachsene Kulturen im Kondenswasser von Kaninchenblutagar, doch fand er die ersten Teilungen nicht. MATHIS hat 1906 im hängenden Tropfen im Kondenswasser erhitzten Blutagars aus den Froschtrypanosomen kleine Kulturformen erhalten und DANILEWSKY's Angaben im großen und ganzen bestätigen können; doch enthält die kurze Mitteilung nichts Näheres über diese Vorgänge. DUTTON, TODD und TOBEY erhielten 1907 in steril aus dem Froschherzen entnommenen Blute, das sie unter dem Deckglase in feuchten Kammern aufbewahrten, dieselben Teilungsphänomene wie DANILEWSKY, geben aber die Zahl der Tochtertiere nur auf ungefähr 64 an (nach MACHADO). FRANÇA hat diese Versuche alle nachgeprüft und einige Resultate erhalten. 1906 hat er im mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparate die Abkugelung und die ersten Teilungen eines dicken gestreiften Exemplares mit freier Geißel („*Tryp. lorica*“) beobachtet, hat jedoch die Weiterentwicklung bis in einzelne kleine Flagellaten nicht beobachten können. 1907 hat er in mehrere Stunden aufbewahrten Deckglaskulturen der glatten Form mit langgestrecktem Kerne im Laubfroschblute die Abkugelung und die ersten Kernteilungen beobachtet, ohne daß es ihm aber gelang, die lückenlose Weiterentwicklung festzustellen. Auch schreibt er dem Blepharoplasten bei der Teilung der glatten Form des Laubfrosches fälschlich die Rolle eines Centrosoms zu, was sich daraus erklärt, daß er die Formen im Trocken-GIEMSA-Präparate

studierte. 1908 gibt er wieder Angaben über die Kultur derselben Form aus dem Wasserfroschblute in mit Paraffin umrandeten Deckglaskulturen, in denen er nach mehreren Tagen kleine Flagellaten fand. Bemerkenswert ist die Abbildung der nicht zerfallenen Form, bei der die Kerne in peripheren Ausstülpungen liegen. Später (1911) berichtet FRANÇA über gelungene Deckglaskulturen von *Tryp. inopinatum*. Mit dessen Kulturformen sind ihm sogar Infektionen gelungen. LEBEDEFF erwähnt 1910, daß ihm ebenfalls Deckglaskulturen und Kulturen in Kapillaren bei *Tryp. rotatorium* im unverdünnten Froschblute gelungen seien. Doch vermutet er, die Kulturen stammten alle von der glatten „gewöhnlichen“ Form mit dem langgestreckten Kerne ab. Die dicke gestreifte Form hält er für steril.

Eine ausführliche Arbeit DOFLEIN's (1910) bringt über die Kulturformen des Froschtrypanosomas nichts Neues. DOFLEIN ist es nie gelungen, die ersten Teilungen der eingesäten Froschtrypanosomen zu beobachten, obgleich darüber schon die Angaben von DANILEWSKY, MATHIS, DUTTON, TODD und TOBEY und FRANÇA vorlagen. Seine Ansichten über das Sauerstoffbedürfnis der Kulturformen sind irrig. Der in der Arbeit betonte Zusammenhang zwischen den verschiedenen Trypanosomenformen des Froschblutes, der schon vorher von LAVERAN und MESNIL betont wurde, wird rein dogmatisch festgestellt, ohne daß ein Beweis durch exakte Infektionsversuche erbracht wird. Auch hat DOFLEIN gar keine reinen, von einer bestimmten Form abgeleitete Kulturstämme zu erlangen versucht.¹⁾

Bei allen Versuchen, die ersten Teilungen und den Übergang der großen Froschblutformen in Kulturformen zu beobachten, haben bisher alle Autoren nur spärliche und unsichere Ergebnisse gehabt. Wie sie (FRANÇA, LEBEDEFF) hervorheben, gelingen die Deckglaskulturen nur manchmal. Die feineren Teilungsvorgänge waren gänzlich unbekannt geblieben.

Zum Vergleiche erwähnt sei, daß ROBERTSON 1911 bei Trypanosomen aus Süßwasserfischen Zweiteilung beobachtete, wenn sie dem Blutstropfen reines Wasser oder hypotonische Salzlösungen zusetzte. Sie glaubt in der Tonussenkung den Anreiz zur Teilung erkannt zu haben. SABRAZES, MURATET, LEBAILLY und FRANÇA haben schon vorher ohne Zusatz hypotonischer Lösungen ähnliche Teilungsvorgänge beschrieben.

¹⁾ Bezüglich einer erst nach meiner vorläufigen Mitteilung erschienenen Arbeit DOFLEIN's vgl. Nachtrag!

Meine Kulturversuche.

Meine Aufgabe sah ich vor allem darin, die Kultivierbarkeit der verschiedenen Formen zu untersuchen. Als Medium verwandte ich zunächst Schafblutagar (2,5—3% Nähragar mit Zusatz eines gleich großen oder geringeren Volumens durch Aderlaß aseptisch gewonnenen und durch Schütteln mit Glasperlen defibrinierten Schafblutes). Der Verwendung von Schafblut gebe ich deshalb den Vorzug, weil sich dieses bequemer in größeren Mengen aseptisch gewinnen läßt als das Kaninchenblut, demgegenüber es keinerlei Nachteile zeigt. Die schräg erstarrten Blutagarröhrchen wurden mit Gummikappen verschlossen, über Nacht zur Kondenswasserbildung in den Brutofen gestellt und dann an drei Tagen nacheinander je eine halbe Stunde lang mit den Gummikappen versehen im Wasserbade bei 55—60° C gehalten, um etwa beim Herstellen hereingebrachte Bakterienkeime abzutöten. Das Beimpfen geschah mit drei Ösen Herzblut des aseptisch geöffneten Frosches.

Da mir die langwierige Herstellung unangenehm war und ich stets beobachtet hatte, daß bewachsene Blutagarröhrchen nach Ausschütten des Kondenswassers (zum Zwecke von Injektionen oder zur Herstellung von Präparaten) bald wieder das üppigste Wachstum zeigten, wenn ich 1—2 ccm gewöhnlicher, schwach alkalischer Nährbouillon zusetzte, versuchte ich die Kultur in Blutbouillon, wie sie zur Züchtung des überall weit verbreiteten nichtpathogenen Rindertrypanosomas *Tryp. theileri* = „*Tryp. franki*“ Verwendung findet. Zu der schwach alkalischen Nährbouillon setzte ich die Hälfte oder das gleiche Volumen defibrinierten Schafblutes oder Rinderblutes zu. Die Blutbouillonröhrchen wurden zwei oder drei Male an aufeinanderfolgenden Tagen im Wasserbade eine halbe Stunde lang auf 55° C erhitzt, um 1. die Leucocyten abzutöten, 2. nochmals zu sterilisieren und etwa im Schafblute in geringer Menge vorhandene Trypanosomen, die Anlaß zu falschen Ergebnissen geben könnten, zu töten, 3. um das Komplement, über dessen Einwirkung auf eingesäte Trypanosomen ich noch keine Untersuchungen vorgenommen habe, zu zerstören. Das Ergebnis mit diesem Nährboden war ausgezeichnet. Impft man mit zwei bis drei Ösen Kultur, so bildet sich schon nach 3—4 Wochen auf der Oberfläche der Blutkörperchensäule ein millimeterdicker weißer Belag, der nur aus Kulturtrypanosomen und Leucocyten besteht. Da die Herstellung der Blutbouillon viel bequemer ist und die Anwendung der Gummikappen wegfällt, weil die große Flüssigkeitsmenge (10—15 ccm) der Gefahr des Ver-

dunstens bei bloßem Verschlusse durch Wattepfropfen nicht ausgesetzt ist, empfiehlt sich dieses Verfahren zur mühelosen Züchtung.¹⁾

Der Versuch, festzustellen, welche Form sich am besten züchten läßt, gelang mir darum leicht, weil ich einen Wasserfrosch besaß, der in seinem Blute vorwiegend die gestreifte, dicke Riesenform zeigte. Von seinem Blute wurden neun Blutagarröhrchen mit je drei Ösen beimpft am 19. XII. 12. Alle diese Röhrchen zeigten schon am 25. XII. reichliche Kulturformen. Alle Kulturen gediehen üppig. Subkulturen gelangen im Kondenswasser von Blutagar und in Blutbouillon. Zur Zeit der Niederschrift (Anfang März 1913) züchte ich diesen Stamm in vierter und fünfter Generation. Diese Subkulturen zeigen das gleiche üppige Wachstum wie die früheren. Die Abimpfung nehme ich stets vor Ablauf von Monatsfrist mit zwei Ösen vor.²⁾

Die glatte geißeltragende Form konnte ich deshalb prüfen, weil mir einige Laubfrösche zur Verfügung standen, welche in ihrem Blute ausschließlich diese Form beherbergten. Vom Herzblute eines dieser Laubfrösche, die die Trypanosomen allerdings ziemlich spärlich zeigten, wurden am 18. I. 13 acht Blutagarröhrchen mit je zwei Ösen beimpft. Von den acht Röhrchen gingen nur zwei an, die kleine Kulturformen nach 2 Wochen in spärlicher Menge zeigten. Subkulturen gelangen, zeigten jedoch nicht das üppige Wachstum wie die Kulturen der dicken gestreiften Form.³⁾

Das Vorkommen echter kleiner Trypanosomen neben den abgekugelten und den Crithidienformen in gut bewachsenen Kulturen ist bekannt. Um festzustellen, ob sie etwa besonders durch Sauerstoffzutritt bedingt sind, wie FRANÇA vermutet, züchtete ich einige Blutagarröhrchen mit Kulturformen der dicken Form eine Woche lang, einige andere seit dem Beimpfen über einen Monat nach dem BUCHNER'schen Pyrogallolverfahren anaerob. Die anaerob gezüchteten Kulturen zeigten dasselbe üppige Wachstum wie die bei Luftzutritt gehaltenen. Einen Unterschied in den Kulturformen konnte ich nicht feststellen.

¹⁾ Alle meine Kulturen wurden bei Zimmertemperatur dunkel aufbewahrt. Auch das *Trypanosoma lewisi* läßt sich in dieser Weise in Blutbouillon züchten.

²⁾ Dieser Stamm war Ende Mai 1913 noch für Grasfroschkaulquappen (in 8. Generation) infektiös. Anfang August wurde er in 12. Generation geführt. Vgl. Nachtrag!

³⁾ Die glatte geißeltragende Form des Laubfrosches wächst im Kondenswasser von Blutagar viel schwieriger als die dicke gestreifte. Ein im Juni 1913 gezüchteter Stamm starb schon in erster Generation aus. Subkulturen gelangen nicht.

Ich möchte hier ausdrücklich darauf hinweisen, daß bei den größeren Kulturformen die Kernstruktur schon am lebenden Objekte fast stets sehr deutlich zu erkennen ist. Innerhalb des ringartigen Außenchromatins (Membran?) ist durch eine Kernsaftzone geschieden das runde Caryosom deutlich sichtbar.

Die Kultur der Kaulquappentrypanosomen habe ich bisher noch nicht versucht.

Die Deckglaskulturen.

Die großen Vorteile der Kultur der Trypanosomen zwischen Objektträger und Deckglas liegen auf der Hand. Lückenlose Lebendbeobachtungen mit starken Systemen allein sind geeignet, die Art und Schnelligkeit der Teilungsfolgen zu ermitteln. Darum verwendete ich viel Mühe auf die Erprobung einer sicheren Methode der Deckglaskultur. Der hängende Tropfen scheidet aus, weil er dem Immersionssysteme nicht überall zugänglich ist. In mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparaten, die reines Froschblut mit der dicken gestreiften Riesenform enthielten, sah ich die Trypanosomen noch nach Wochenfrist unverändert am Leben, konnte jedoch keine Teilungen finden. Mit Zusatz von reinem Wasser, wie ihn ROBERTSON bei Fischtrypanosomen benutzt, hatte ich keine Ergebnisse. Erst als ich den blutkörperchenfreien Abguß von Schafblutbouillon, die zweimal auf 55° C erhitzt worden war, benutzte, gelangen mir alle Deckglaskulturen. Bei der Herstellung der Deckglaskulturen verfuhr ich sauber, aber nicht aseptisch, wie folgt: Auf die mit Alkohol sauber geputzten Objektträger gebe ich zwei kleine Tropfen (Ösen) Blutbouillonabguß, entnehme dann dem Frosche mit reiner Pipette einen Tropfen Blut aus der angestochenen *Vena facialis*, bringe diesen Tropfen schnell ehe etwa Gerinnung in der feinen Pipette eintreten kann, in den Bouillontropfen auf dem Objektträger und lege das saubere Deckglas langsam schräg aufsetzend so auf, daß Blut und Bouillon gleichmäßig gemischt sind. Tritt etwas von dem zu großen Tropfen über die Deckglasränder hervor, so wartet man eine Weile, bis dieser Überschuß eben eingetrocknet ist und umzieht dann das Deckglas schnell, mit einem erwärmten Spatel oder Messerrücken gut mit Paraffin. Zu beachten ist natürlich, daß der Spatel nicht allzu stark erhitzt wird, daß er etwa durch seine Hitze die Trypanosomen im Präparate zum Absterben bringt. Die Menge des zugesetzten Blutes habe ich meist etwas kleiner bemessen als die Blutbouillonmenge, doch gibt auch die Mischung gleicher Teile ebenso gute Ergebnisse. Nachträglich unter dem Deckglase

eintretende kleine Blutgerinnungsbezirke schaden in der Regel nicht. Die umrandeten Deckglaskulturen können sowohl mit starken Trockensystemen, wie auch mit Immersion besichtigt werden. Aufbewahrt habe ich sie stets dunkel bei Zimmertemperatur (bei $+10$ bis $+25^{\circ}$ C). Nächtliches Sinken der Temperatur bis auf $+10^{\circ}$ C hat keinen nachteiligen Einfluß auf die Entwicklung. Geringes Bakterienwachstum schadet nicht.

Zunächst beobachtete ich die dicke gestreifte Varietät in den Deckglaskulturen (Fig. 11—21). Drei Wasserfrösche hatte ich am 3. II. 13 mit großen Mengen stark bewachsener Kultur des am 19. I. 12 gewonnenen Stammes von der dicken gestreiften Form intraperitoneal gespritzt. Seit 7. II. zeigten alle drei Frösche spärliche Trypanosomen. Vom 15. II. bis Anfang März zeigten diese Frösche nur die dicke gestreifte Varietät im Blute. Während dieser Zeit wurden zahlreiche Deckglaskulturen in der angegebenen Weise angelegt, welche sämtlich gelangen. Da die Trypanosomen nicht sehr häufig im Blute vorhanden waren, konnte ich bei über hundert Exemplaren die ersten Teilungen bis in 20—30 geißellose Tochtertiere, in den länger aufbewahrten Präparaten die Weiterentwicklung in Crithidien im Leben verfolgen. Allerdings machen nicht alle Exemplare in den Deckglaskulturen die Teilungsvorgänge schnell und gleichzeitig durch, sondern einzelne bleiben 24 Stunden lang ungeteilt. Bei der weitaus überwiegenden Mehrzahl dagegen erfolgt die Entwicklung wie folgt: In den ersten Stunden beginnen die großen Trypanosomen ihre Streifung zu verlieren, die Bewegungen der undulierenden Membran verlangsamen sich, die Saumgeißel wird undeutlicher und die Membran verschwindet allmählich ganz. An einer Seite der abgerundeten Form findet man manchmal noch kleine flache Protoplasmaanhänge, die wohl als Reste des teilweise abgestoßenen Periplastes anzusprechen sind (Fig. 12). An dem deutlich sichtbaren Caryosome werden Umformungen sichtbar. Schließlich folgt die Kernteilung und darauf die Durchschnürung des gekörnten Protoplasmaleibes. Die beiden Tochtertiere bleiben auf derselben Stelle liegen und gleichen in ihrem Aussehen abgerundeten Limaxamöben mit kompaktem Caryosomkerne und dichtem, körnigem Protoplasma. Häufig zeigt auch ihr Rand stumpfe pseudopodienartige Fortsätze. Diese erste Teilung mag normalerweise 5—6 Stunden nach Anlage der Kultur stattfinden. In dieser Art geht die Teilung der Formen bis ungefähr zur 20.—24. Stunde weiter. Die durch die nacheinanderfolgenden Teilungen entstandenen Tochtertiere werden kleiner und ihr Protoplasma wird vacuolig. Die Teilungs-

art ist fast stets Zweiteilung. Formen mit mehr als zwei Kernen sind sehr selten. Die Kerne der runden bis amöbenartigen Tiere sind stets deutlich als Kernsaftzone und rundes kompaktes Caryosom sichtbar. Da die Tochtertiere geißellos sind, bleiben sie alle bei- einander bis zur 24. Stunde bewegungslos liegen.¹⁾ Die Zahl der Teilindividuen, die um diese Zeit einen solchen Haufen bilden, schwankt, beträgt aber meist 20—32. Doch kommen größere und kleinere Werte vor (8—36). Um die 20.—24. Stunde beginnen diese Haufen besonders an ihren Rändern langsam wackelnde oder zitternde Bewegungen zu machen, und bei genauem Hinsehen mit dem Im- mersionssysteme gewahrt man dort langsam schlagende kurze Geißeln. In den nächsten 20 Stunden erfolgt weitere Zweiteilung in kurze *Leptomonas*-artig gebaute Flagellaten mit kurzer Geißel; alle Exem- plare bleiben noch in einem bewegten Haufen zusammenliegen. Nach 42—48 Stunden strecken sich am Rande des Haufens viele Flagel- laten in die Länge, nehmen die bekannte schmale Crithidienform an, lösen sich los und verbreiten sich allmählich in der Umgebung, in der sie an den folgenden Tagen einzeln oder in kleineren Haufen anzutreffen sind. Sie sind sehr klein, schlank, und zeigen eine schwache, aber deutliche undulierende Membran. Die Deckglas- kulturen bleiben in der Regel fünf bis sieben Tage am Leben, ehe die Bakterienwucherung größeren Umfang annimmt. Um die Zahl der Tochtertiere festzustellen, zählte ich in einer Deckglaskultur, die nur wenige große, dicke, gestreifte Trypanosomen in einzelner Lagerung enthalten hatte, 42 Stunden nach Herstellung der Deckglas- kultur fünf Haufen mit kurzen *Leptomonas*-artigen Flagellaten durch.

Haufen 1 hatte 149 Flagellaten,

„	2	„	78	„
„	3	„	131	„
„	4	„	164	„
„	5	„	150	„

Da die Abstammung der einzelnen Haufen in jener Kultur von je einem einzigen Muttertiere zweifellos feststand, so ergibt sich die durchschnittliche Vermehrung eines Exemplares bei ungefähr 20° C in der Deckglaskultur auf 134—135 Tochtertiere in 42 Stunden. Da Zweiteilung die Regel ist, ergibt sich eine durchschnittliche Teilungsfolge von 6 Stunden.²⁾

¹⁾ In einer neuerdings erschienenen Arbeit bildet OGAWA solche ungefähr 24 Stunden alte geißellose Tochtertiere als jüngste Kulturformen ab. Die vorher- gehenden Teilungen hat er nicht beobachtet.

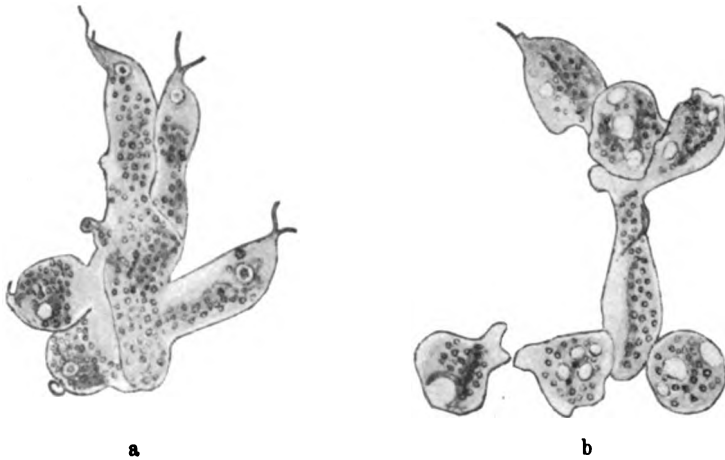
²⁾ Dieselbe Teilungsfolge wird eingehalten, wenn dem Blutbouillonabguß

Trotz vieler Mühe gelang es mir nicht, den Kernteilungsvorgang am lebenden Objekte genau genug zu studieren, um die Rolle des Blepharoplastes bei der Kernteilung festzulegen, da der Blepharoplast von den zahlreichen, in das dichte Protoplasma eingelagerten Körnern sich im Leben nicht mit Sicherheit unterscheiden läßt. Deshalb stellte ich in Sublimatessig feucht fixierte Ausstriche her, die ich mit HEIDENHAIN'S Eisenhämatoxylin oder mit Hämalaun (Differenzierung mit salzsaurem Alkohole) färbte. Eine mitotische Teilung des Blepharoplastes habe ich in diesen Präparaten nie auffinden können. Die einzigen auf seine Teilung hinweisenden Anzeichen fand ich in starker Verbreiterung des ohnehin schon stäbchenförmigen quergestellten Organs (Fig. 21). Er ist verhältnismäßig klein und wird beim Differenzieren leicht entfärbt, da das Protoplasma den Farbstoff schwer abgibt. Doch ist er in manchen Exemplaren während aller Phasen der Kernteilung nachzuweisen. Die ersten Anzeichen der Kernteilung bildet die Anordnung des Chromatins auf einer Seite des Caryosoms, so daß eine halbmond- bis sichelförmige Chromatinfigur entsteht (Fig. 11). Späterhin findet sich das Chromatin in einer Art Äquatorialplatte in der Mitte des Kernes (Fig. 15), noch später in zwei Platten, die an die entgegengesetzten Seiten des schon gestreckten Caryosoms gerückt sind (Fig. 16). Darauf erfolgt das Auseinanderrücken der beiden quer abgestutzten Chromatinlager, zwischen denen ein schwächer gefärbtes Fadensystem sich ausspannt (Fig. 17, 18, 20). Später wird dieses in seiner Mitte dünn und verbindet als Fibrille die beiden dreieckigen Tochterkerne, an deren Basis das meiste Chromatin liegt (Fig. 19). Spitze Strahlungszentren, wie sie ROSENBUSCH bei der Kernteilung anderer Trypanosomen abbildet, habe ich nicht gefunden. Der Kernteilungsvorgang ist als primitive Mitose zu bezeichnen.

Auch an der glatten geißeltragenden Form mit dem gestreckten Kerne konnte ich in den Deckglaskulturen im Leben die Vermehrungsvorgänge bis zum Zerfall in kleine Crithidien verfolgen. Das Ausgangsmaterial bildete das Herzblut eines Laubfrosches, das ausschließlich diese Form enthielt. FRANÇA hat von ihr angegeben, der Blepharoplast spiele bei der Teilung die Rolle eines Centrosoms. Auch beim Wasserfrosche hat er die Deckglaskultur dieser Form erhalten, hat jedoch hier die Rolle des Blepharoplastes nicht in dieser Art angegeben.

2 Proz. Natriumzitrat zugesetzt werden. Zusatz von physiologischer (0,85 Proz.) Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser zum Froschblute hat keine Vermehrung zur Folge.

In meinen Deckglaskulturen (— Blutbouillonzusatz zum Laubfroschblute! —) verloren die Trypanosomen in kurzer Zeit, meist im Verlaufe von 30–60 Sekunden, seltener erst nach 2–3 Stunden die undulierende Membran. Der Kern rückt in die Mitte der flachen, zunächst noch unregelmäßig blattartig gekrümmten Form und ein am Kerne inserierender Geißelstummel schlägt noch einige Zeit. Das Protoplasma bekommt Körnelung. Der Kern ist nur undeutlich in der Mitte der sich abrundenden Form sichtbar. Um die fünfte Stunde bildet sich bei vielen Formen in der Mitte eine Einschnürung, ohne daß jedoch ein Durchreißen zu beobachten ist. Die Protoplasmamasse bleibt vielmehr meistens tagelang im Zusammenhange, während sich die Kerne vermehren. Nach 20 Stunden zeigen die meisten Exemplare 4 lange schlauchförmige Ausstülpungen, die an ihrer Basis zusammenfließen, und deren freie Enden Abrundung



Textfig. A. Deckglaskultur eines Laubfroschtrypanosomas (Form mit gestrecktem, polarisiertem Kern). Ungefärbt. 1000 \times . a) 72 Stunden nach Ansetzen der Kultur. b) Derselbe Haufen; 93 Stunden nach Ansetzen der Kultur.

zeigten. Das ganze, einem keimenden Pilze gleichende Gebilde erschien ziemlich dünn im Gegensatze zu den kompakten Formen bei den Kulturen der dicken Trypanosomen. Nach 48 Stunden zeigten die Vermehrungsformen 5–30 längliche Ausläufer, die ebenfalls noch an ihrer Basis zusammenhingen. Manche der Ausläufer waren schmaler geworden, manche dagegen hatten sich abgerundet, manche auch schon losgelöst. Kerne waren nicht deutlich sichtbar. Das Protoplasma erschien noch dünner als vorher. Die Körnelung war nicht überall wahrzunehmen. Nach 72 Stunden sproßten aus den

Spitzen mancher dieser länglichen Ausläufer je 1—2 kurze Geißeln hervor, die langsam schlugen (Textfig. A). An der Basis je einer oder zweier Geißeln ließ sich ein kernartiges Gebilde wahrnehmen. Nach 96 Stunden konnte ich dasselbe Spiel noch an einigen Formen wahrnehmen, ja an einer Form sah ich noch nach 117 Stunden an der Spitze eines Ausläufers eine bewegliche kurze Geißel. Nach 120 Stunden zeigten die sehr durchsichtigen Formen in ihrem Inneren Streifungen und Strukturen, die auf einen Zerfall hindeuteten. Um diese Frist (96—144 Stunden) zeigten sich in Dauerpräparaten stets schon Ballen und Haufen kleiner Crithidien. Die Lagerung und Größe der Haufen entsprach den Umrissen oder den Größenverhältnissen von länglicheren oder rundlichen Ausläufern zusammengesetzter Teilungshaufen. Deshalb erscheint es mir nicht unwahrscheinlich, daß schon innerhalb des Periplastes der rundlichen, schlauchartigen oder zugespitzten Ausläufer der Zerfall in jene kleinen Tochtertiere mit ihrem undeutlichen Geißelapparate und mit dem Blepharoplaste unmittelbar am Kerne statthat. Freilich ist es mir selbst mit dem Immersionssysteme und Kompensationsokularen bisher nicht gelungen, im Leben in diesen protoplasmaarmen Ausläufern die Kerne und Abgrenzungen der kleinen Tochtertiere zu beobachten. Ihre genaue Zahl kann ich deshalb auch nicht angeben. Doch ist schon auf Grund dieser Beobachtungen festgestellt, daß die Teilung der geißeltragenden Form mit dem länglichen Kerne sowohl durch die Langsamkeit des Zerfalls in kleine Tochtertiere (4—6 Tage gegen 42 Stunden) wie auch durch das Zusammenhängen des Protoplasmas und durch die knospenartige Ausstülpung der schlauchförmigen Ausläufer, die tagelang im Zusammenhange bleiben, von der Teilungsweise der dicken Form gänzlich abweicht. Mir erscheint dieser Teilungsvorgang geradezu als ein degenerativer, eine Auffassung, die durch die mangelhafte Beschaffenheit der Protoplasmaausläufer und die Undeutlichkeit der Kerne gestützt wird.

Von großer Wichtigkeit ist das Verhalten dieser Form unmittelbar nach dem Zusatze der Blutbouillon. Die Einziehung der undulierenden Membran erfolgt schon nach wenigen Sekunden bis Minuten. Die zunächst dünne, blattartige und an den Rändern unregelmäßig gefaltete und gekrümmte Form zeigt in der Mitte einen ovalen bis rundlichen hellen Hof, der den Kern bezeichnet. Von den beiden spitzen Chromatinkappen ist nichts mehr zu finden. Sie scheinen zusammengeflossen zu sein. Der Blepharoplast rückt in unmittelbare Nähe des Kerns. Er scheint jedoch nicht hineingezogen zu werden, da die Insertion des Geißelstummels immer noch

außerhalb der Kernmembran liegt. Oft verschwindet der noch schwach bewegliche Geißelstummel ziemlich schnell. Die sehr große Labilität der Form bei der Varietät mit dem gestreckten Kerne verbietet uns, in dem *Tryp. chattoni* MATHIS und LEGER eine besondere Art zu erblicken. Wahrscheinlich herrschen im Blute des Wirtes, einer Kröte (*Bufo melanostictus*) aus Tonkin, physiologisch dieselben Verhältnisse, wie sie sich beim Laubfrosche durch Zusatz von Blutbouillon erzeugen lassen, und die die Reduktion des Geißelapparates und das Heranrücken des Blepharoplastes an den Kern bedingen. Auch hat MACHADO bei *Tryp. rotatorium* dieselben flachen, geißellosen Formen im Blute der Frösche gefunden; er hält sie für die Ausgangsstufen der von ihm beschriebenen multiplen Teilung.

Infektionsversuche ohne Überträger.

Der Infektionsversuch, der bei den pathogenen Trypanosomen eine so große Wichtigkeit besitzt, hat bei den normalerweise sich nicht vermehrenden oder doch sehr wenig teilungsfähigen Froschtrypanosomen bisher keine Rolle gespielt, zumal da manchmal fast alle Wasserfrösche schon mit den Trypanosomen infiziert sind. LEBEDEFF berichtet 1910 über ungefähr 100 Versuche, eine Infektion durch Einspritzen des Blutes „chronisch“ infizierter Frösche zu übertragen, die alle mißlangen. Seine Angaben über einige positive Ergebnisse bei „akuter“ Mischinfektion mit einem froschpathogenen Bazillus sind schon deshalb unbrauchbar, weil die Versuchsfrösche schon nach 2—3 Tagen starben, ohne daß eine Vermehrung beobachtet wurde. Versuche, mit Kulturformen zu infizieren, unternahm zuerst BOUET 1906, der jedoch keinen Erfolg hatte. Dagegen berichtet LEBEDEFF 1910 über fünf Versuche, in denen es ihm gelungen ist, durch Einspritzung von Kulturformen eine Infektion zu erzeugen. Nach 3—4 Tagen erschienen spärliche Trypanosomen der geißeltragenden glatten Form mit gestrecktem Kerne. Ihre Zahl nahm nicht wesentlich zu. Sie verschwanden nach $2\frac{1}{2}$ bis 3 Wochen, ohne daß Teilungsformen aufgetreten wären.

Eigene Infektionsversuche.

Über die unsicheren Versuche, erwachsene Frösche mit Kaulquappentrypanosomen zu infizieren, ist schon berichtet worden. Drei weitere Versuche wurden mit Kulturen der großen dicken Form an erwachsenen Wasserfröschen angestellt. Die drei Wasserfrösche

hielt ich seit 5 Monaten in Gefangenschaft. Zahlreiche Blutuntersuchungen hatten bei zwei Fröschen kein Ergebnis. Der eine dagegen hatte vor 6 Wochen spärliche Trypanosomen gezeigt (Frosch 1). Dem Frosche 1 spritzte ich am 3. II. 13 den Inhalt eines sehr stark bewachsenen Blutagarröhrchens, dem früher Bouillon zugesetzt worden war, intraperitoneal ein. Den Fröschen 2 und 3 injizierte ich am gleichen Tage ebenso den Inhalt dreier Blutagarröhrchen, die eine Woche lang anaerob gehalten worden waren und üppigstes Wachstum zeigten. Am 7. II. 13 zeigten die Frösche 2 und 3 spärlich typische, dicke, gestreifte Formen, deren Zahl bis zum 17. II. stark zunahm, ohne daß ich jedoch im peripheren Blute Übergangsformen oder Teilungen finden konnte. Von da ab nahm die Zahl der Trypanosomen beständig ab. Am 4. III. waren fast alle Trypanosomen aus dem peripheren Blute verschwunden.

Der Frosch 1 dagegen, bei dem also eine alte Infektion früher festgestellt worden war, bot das Bild einer echten Neuinfektion, bei der es mir zum ersten Male gelungen ist, im peripheren Blute eine echte Teilungsform zu sehen. Am 7. II. 13 fand ich in vier Präparaten ein einziges Trypanosoma mit schlankem, ungefähr blutkörperchenlangem Protoplasmakörper, schnabelförmig zugespitztem Hinterende, deutlich entwickelter undulierender Membran und über halb körperlangem, freiem Geißelende. Die undulierende Membran begann wenige μ vor dem Hinterende. Am 8. II. hatte ich das Glück, eine Längsteilungsform dieses kleinen Trypanosomas zu beobachten: Die beiden Flagellaten, deren jeder schon eine undulierende Membran und freie Geißel zeigte, hatten sich schon in der vorderen Hälfte getrennt und hingen nur noch mit dem hinteren Drittel zusammen. Leider gelang es mir nicht, in den angefertigten Dauerpräparaten eine Teilungsform zu finden. Neben dieser kleinen Form fand sich schon spärlich eine gleich gebaute mit etwas größeren Maßen, die auf dem Periplast schon deutlich schwache Längsstreifung zeigte. Auch sah ich schon ein Exemplar der dicken, rundlichen, gestreiften Form und einige unregelmäßige Zwischenformen, die LEBEDEFF als indifferente bezeichnet. Vom 11. II. ab verschwanden die schlanken Exemplare mit scharf zugespitztem Hinterende und freier Geißel; es blieb nur die dicke, gestreifte Form übrig, die sich bis zum 17. II. in wachsender Anzahl zeigte, von da ab aber abnahm und am 6. III. fast verschwunden war. Weitere Infektionsversuche wurden an Laubfröschen vorgenommen. Von 15 Laubfröschen aus einer Münchener Tierhandlung war einer mit der glatten geißeltragenden Form mit langgestrecktem Kerne infiziert. Von dieser

Form wurden, wie erwähnt, zwei Kulturen im Kondenswasser von Blutagar gewonnen. Am 3. II. 13 wurden zwei Laubfrösche mit dem Inhalte einer dieser schwach bewachsenen, 16 Tage alten Kulturen intraperitoneal gespritzt. Am 8. II. 13 zeigten beide Laubfrösche die geißeltragende glatte Varietät mit langgestrecktem Kerne im Blute. Die Zahl der Trypanosomen nahm nicht wesentlich zu. Nur einmal (am 8. II.) gelang es mir, bei einem der beiden Laubfrösche eine kleine Übergangsform aufzufinden. Acht Versuche, mit schwach bewachsener Kultur der gestreiften dicken Form vom Wasserfrosche eine Infektion zu erzeugen, schlugen fehl, vor allem wohl auch darum, weil ich von den nicht stark bewachsenen Kulturen zu kleine Dosen (0,1—0,3 ccm) einspritzte. Deshalb machte ich vier weitere Versuche mit größeren Mengen (0,5 ccm) älterer, sehr stark bewachsener Blutagarkulturen, denen ich Bouillon zugesetzt hatte. Am 11. II. 13 spritzte ich zwei Laubfrösche, von denen einer am 16. II. Trypanosomen zeigte. Am 16. II. spritzte ich zwei weitere Laubfrösche, von denen einer am 23. II. eine Infektion zeigte. Hervorzuheben ist, daß alle Laubfrösche stets nur die glatte Form mit dem langgestreckten Kerne zeigten, niemals die dicke gestreifte Form.

FrISCHE Infektion, ReZidiv oder Superinfektion?

Eine frische Trypanosomeninfektion kennzeichnet sich im allgemeinen dadurch, daß nach Ablauf der Inkubationszeit im peripheren Blute stürmische Vermehrung einsetzt, bei der es zur Bildung kleinerer und größerer unregelmäßiger Trypanosomen kommt. Erst nach Ablauf der Vermehrungsperiode nehmen alle Trypanosomen eine ziemlich feste gleichmäßige Gestalt an. Bei den pathogenen und den Rattentrypanosomen wird diese ziemlich konstante Gestalt während der ganzen Periode der Infektion beibehalten. Andere Trypanosomen zeigen ihre typische Trypanosomengestalt nur am Anfange der Infektionszeit nach Ablauf der stürmischsten Vermehrungsperiode, während sie später einen mehr oder minder großen Formenreichtum aufweisen. Zu dieser Gruppe gehören die nichtpathogenen Rindentrypanosomen der *Theileri*-Gruppe („*Tryp. franki*“), die Trypanosomen des Waldkauzes und anderer Vögel und vor allem das *Trypanosoma rotatorium* der Frösche. Alle diese besitzen im späteren Verlaufe der Infektion neben anderen Typen auch die charakteristischen Riesenformen, die wegen ihrer Größe viel Beachtung gefunden haben, und die höchstwahrscheinlich die leichte Kultivierbarkeit bedingen. Gemeinsam haben alle in den Zeiten, in denen die Infektion schon

jahrelang zurückliegt, das spärliche Vorkommen von Trypanosomen und das gänzliche Fehlen von Teilungsformen im peripheren Blute. Betrachten wir nach diesen Gesichtspunkten die positiven Infektionsversuche LEBEDEFF's (und meine Ergebnisse, so läßt sich in keinem Falle sicher entscheiden, ob es sich um wirkliche Neuinfektionen oder Rezidive oder Superinfektionen handelt. Für Neuinfektionen spräche das von mir in zwei Fällen beobachtete Auftreten kleiner Zwischenformen und einer Teilungsform, die ich aber gerade bei dem Frosche sah, bei dem ich früher eine Infektion festgestellt hatte. Dagegen spricht der Umstand der spärlichen Vermehrungsformen im peripheren Blute und die Tatsache, daß sehr viele Frösche, die normalerweise keine Trypanosomen im Blute aufwiesen, beim Wechsel der Lebensbedingungen Rezidive zeigen. Ich halte schon das im Sommer häufige Vorkommen der Trypanosomen für eine durch den lebhafteren Stoffwechsel des Wirtes bedingte Rezidivbildung. Diese Erscheinung als Neuinfektion ansprechen zu wollen, halte ich für verfehlt, weil bei keinem Trypanosoma bis jetzt mit Sicherheit eine sterilisierende Immunität nachgewiesen ist, und weil *Hemiclepsis marginata* in unseren Gegenden nur ungern das Blut erwachsener Frösche aufnimmt. Außerdem habe ich mehrfach zweifellose Rezidive gesehen, wenn ich vorher kühl gehaltene Frösche für längere Zeit in ein geheiztes Zimmer brachte. Diese mehrfach experimentell gesicherte Tatsache spricht zweifellos dafür, daß die Kaltblütlertrypanosomen um so bessere Lebensbedingungen finden, je mehr der Stoffwechsel des Wirtes gesteigert ist. Ganz bekannt ist ja aus der Pathologie der Warmblütler die Erscheinung, daß bei vielen Infektionskrankheiten krankheitserregende oder harmlose Blutprotozoen, die aus dem peripheren Blute schon lange verschwunden waren, wieder auftauchen und sich vermehren.¹⁾ Ich führe diese Erscheinung darauf zurück, daß infolge des gesteigerten Stoffwechsels (Fieber!) einerseits den Parasiten mehr Nahrungsstoffe zur Verfügung stehen, andererseits vielleicht wachstumshemmende Substanzen nicht in genügender Menge gebildet werden können. Daß gerade nach Einspritzungen Rezidive eintreten, habe ich einmal auch bei Einspritzung sicher trypanosomenfreien Blutes gesehen. Offenbar wirkt hier die parenterale Zufuhr großer Eiweißmengen tiefgreifend auf den ganzen Stoffwechsel des Wirtes ein. Daß der Wasserfrosch (wie viele Amphibien) in bezug auf diese Rezidiverscheinungen und Latenzperioden

¹⁾ C. SCHILLING bezeichnet deshalb neuerdings sehr treffend diese Art der Protozoeninfektion als „labile Infektion“.

ganz besonders komplizierte Verhältnisse bietet, beruht darauf, daß in seiner Entwicklung das Leben im Wasser wie auf dem Lande vorkommt und daß in seinem späteren Leben in den nicht tropischen Gegenden lange Perioden gesteigerter Lebensfunktion mit Zeiten vollkommener Ruhe abwechseln. Daß diese verschiedenen Zustände und Einwirkungen an den Parasiten nicht spurlos vorübergehen, steht fest. Ebenso sicher ist aber auch die Hoffnung begründet, daß wir an den Amphibientrypanosomen infolge der Möglichkeit der Prüfung der auf den Wirt einwirkenden Bedingungen viel für das Verständnis der Biologie anderer Trypanosomen lernen können. Meine Angaben sollen jetzt nur in dieser Richtung zur Anregung dienen. Eine weitergehende Aufklärung über diese interessanten Verhältnisse können erst jahrelang durchgeführte Infektions- und Rezidivbeobachtungen an Fröschen, die aus Eiern erzogen sind, bringen.

Welche physiologischen, physikalischen, chemischen Faktoren bedingen Wachstum und Form der Trypanosomen? Welche Faktoren hemmen das Wachstum? Vermehrungsphysiologie der Trypanosomen.

Über den Stoffwechsel der Trypanosomen ist bis jetzt nahezu nichts bekannt. Wir wissen nicht einmal sicher, ob die pathogenen Trypanosomen gelöste Gifte abscheiden oder ob sie durch ihre Leibessubstanz toxisch wirken. Wie jeder lebende Organismus muß sich auch jedes Trypanosoma seine Leibessubstanz aus Körpern aufbauen, die durch abbauende Fermente ihrer chemischen Struktur beraubt sind und durch die aufbauenden artspezifischen Fermente zu den spezifischen Zellbestandteilen im Sinne E. FISCHER'S und ABDERHALDEN'S aufgebaut werden. Daß die Trypanosomenfermente für Eiweißverdauung nicht auf die Eiweißkörper des Wirtstieres spezifisch eingestellt sind (im Gegensatze zu vielen intrazellulären Sporozoen!), beweist der Umstand, daß die meisten Trypanosomen in mit ganz verschiedenartigen Blutarten hergestellten Nährböden gezüchtet werden können. *Tryp. rotatorium* wächst in Nährböden von Froschblut (DANILEWSKY, LEBEDEFF), Kaninchenblut (BOUET), Schafblut und Rinderblut (NÖLLER) und sicherlich auch in fast allen weiteren Blutarten von Wirbeltieren. Blutfarbstoff (Hämoglobin) scheint aber für das Wachstum unerläßlich zu sein.

Bei dem Leben der Trypanosomen im Blute des Wirbeltierwirtes fällt zunächst nach der Infektion eine stürmische oder doch

schnelle Vermehrung auf, die schnell zu der maximalen Menge der Trypanosomen im Blute führt. Diese Vermehrungsperiode zeigt, daß genügend Nahrungsstoffe vorhanden sind und von dem Wirt noch keine hemmenden Einflüsse ausgeübt werden. In welcher der beiden angedeuteten Richtungen das Wachstum von Seite des Wirtes eine Hemmung erfährt, ist bis jetzt nicht entschieden. Zahlreiche Forscher glauben die Hauptursache in einer Abwehrmaßregel des Wirtes im Sinne einer nicht sterilisierenden, sondern duldenden Immunität suchen zu müssen. Indessen hat diese der Bakteriologie entlehnte Forschungsrichtung bisher wenig praktische Erfolge gehabt, weil sie den biologischen Unterschied zwischen Bakterien und Trypanosomen nicht genügend hervorgehoben hat. Die Trypanosomen sind als echte Parasiten weder der Phagocytose noch der parenteralen Verdauung durch Auflösung in dem Maße ausgesetzt wie die Bakterien, wenn auch gewisse Phagocytoseerscheinungen in Macrophagen und Endothelien bekannt geworden sind.

Mehr Aufschlüsse dürften schon die Vermehrungsverhältnisse der Trypanosomen selbst versprechen. Mir erscheint die Arbeitshypothese, die eine Erschöpfung (Aufzehrung) spezifischer, zum Wachstum der Trypanosomen nötiger, im Blute aber nur in Spuren vorhandener Substanzen als Ursache des Vermehrungsrückganges annimmt (LIEBIG'sches Gesetz vom Minimum eines Nährstoffes), noch am geeignetsten, den Infektionsverlauf und die Latenz- und Rezidivperioden zu erklären, da über die Erhöhung des Eiweißstoffwechsels bei Eintritt des Sommers beim Kaltblütler und bei fieberhaften Infektionskrankheiten der Warmblütler kein Zweifel besteht. Noch andere Faktoren kommen nach zoologischen Theorien in Betracht: In Kulturen Einzelliger tritt eine Depression infolge ausgeschiedener Stoffwechselprodukte ein, die die Vermehrung hemmen. Neuerdings hat CARREL die Richtigkeit dieser Hypothese auch an seinen Metazoen-gewebskulturen *in vitro* glänzend bewiesen. Ein Auswaschen der Gewebe und Wechsel der Kulturflüssigkeit brachte bei Gewebeskulturen, die schon aufgehört hatten zu wachsen, neues Wachstum hervor. Da sich die Trypanosomen im Blute des Wirbeltierwirtes in einem geschlossenen Systeme befinden, so läßt sich nach diesen Ergebnissen das Aufhören der Vermehrung auch durch Anhäufung von hemmenden Exkretionsstoffen erklären. Es ist nicht möglich, eine einzelne Ursache für das Aufhören der Vermehrung verantwortlich zu machen. Vielmehr ist höchst wahrscheinlich, daß mehrere Einflüsse gleichzeitig in einem gewissen Grade beteiligt sind. Die Annahme der Notwendigkeit eines Sexualaktes zur Wiedergewinnung der Vermehrungs-

fähigkeit fällt bis jetzt als Erklärungsmöglichkeit schon deshalb ganz weg, weil trotz eifrigster Bemühungen bisher noch kein einziger Forscher für die Trypanosomen das Vorkommen eines Geschlechtsaktes hat nachweisen können.

Haben die Trypanosomen im chronischen Stadium der Infektion mit dem Blute des Wirtes dessen Körper verlassen, so scheiden die Einflüsse des Wirtes aus, und die Wirkung physikalisch-chemischer Faktoren läßt sich bequemer prüfen.

Wichtig ist schon die Beobachtung, daß sich im unverdünnten Blute beim Froschtrypanosoma gelegentlich Teilungsvorgänge abspielen (DANILEWSKY, FRANÇA und ATHIAS, DUTTON, TODD und TOBEX, LEBEDEFF), daß diese Vorgänge sich dann aber nur gelegentlich beobachten lassen. Es läßt sich leider nicht feststellen, ob die Autoren das Blut von Fröschen benutzt haben, die eben ein frisches Rezidiv bekamen und bei denen deshalb Hemmungen für die Entwicklung nicht vorhanden waren. Daß schon die bloße Bewegungslosigkeit des Blutes Teilung hervorruft, ist nicht wahrscheinlich. Sicher dagegen läßt sich die Teilung durch das Einsäen in Kondenswasser von Blutagar und in Blutbouillon stets hervorrufen. Das Kondenswasser und die Blutbouillon sind meist dem Blute isotonisch, manchmal etwas hypotonisch. Sie enthalten stets etwas Hämoglobin in Lösung. Ihre teilungsanregende Wirkung dürfte sich deshalb in zwei Richtungen geltend machen: 1. in einer Verdünnung des Blutes und deshalb in einer Aufhebung oder doch Verminderung der Wirkung der darin enthaltenen hemmenden Substanzen; 2. in der Zufuhr neuer Nährstoffe.

Durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung konnte ich keine Teilung hervorrufen; durch Zusatz reinen Wassers habe ich bisher keine Ergebnisse erhalten. ROBERTSON, die dieses Verfahren bei Fischtrypanosomen anwandte, sieht in der Tonussenkung der Nährlösung und in der durch die hypotonische Lösung bedingten Wasseraufnahme durch die Trypanosomen den Anreiz zur Teilung. Trotz der zahlreichen angeführten Kontrollversuche kann ich mich von der ursächlichen Bedeutung der Tonussenkung nicht überzeugen, weil SABRACES, MURATET, LEBAILLY und FRANÇA dieselben Teilungsphänomene im unverdünnten Blute bei Fischtrypanosomen beschrieben haben. Auch ist die Möglichkeit vorhanden, daß der Zusatz von Wasser nur im Sinne einer Verdünnung hemmender Stoffe gewirkt hat, eine Ansicht, die sich allerdings mit den Kontrollversuchen ROBERTSON's nicht in Einklang bringen läßt.¹⁾

¹⁾ Nach den neueren Angaben PONSSELLE's scheinen die Süßwasserfischtrypano-

Zufuhr oder Mangel von Sauerstoff macht, wie schon erwähnt, für die Entwicklung in Deckglaskulturen, die mir ebenso wie MATHIS auch im hängenden Tropfen gelangen, wie auch in Kulturröhrchen gar keinen Unterschied. Gedämpftes Tageslicht hemmt die Teilung nicht, auch starke zeitweise Beleuchtung mit dem Kondensor des Mikroskopes beeinflußt die Vermehrung in Deckglaskulturen nicht nachteilig.

Zu beachten bleibt, daß bei den großen Froschtrypanosomen (im Gegensatz zu den Beobachtungen an Süßwasserfischtrypanosomen) unter den künstlichen Verhältnissen erst abgekugelte geißellose Formen, später Crithidien gebildet werden. Doch dürfte die Teilungen des Kaulquappentrypanosomas wegen seiner ursprünglichen Gestalt der der Süßwasserfischtrypanosomen gleichen. Welche Faktoren den Übergang der Crithidien wieder in die Trypanosomengestalt herbeiführen, ist noch nicht ganz klargestellt. FRANÇA's gelegentlich geäußerte Ansicht, die Trypanosomenform sei durch Sauerstoffzufuhr bedingt, fällt damit, daß in aerob wie in anaerob gezüchteten Kulturen keine Formenunterschiede aufzufinden sind. Nach einer neuen Arbeit dieses Forschers (1911), die mir leider nur im Referate zugänglich war, ist es ihm gelungen, durch Mischen von crithiaförmigen Flagellaten aus *Helobdella algira* mit Froschblut und durch wiederholtes Pumpen durch ein Kapillarsystem diese Flagellaten, die er für Entwicklungsformen von *Tryp. rotatorium* hält, in die Trypanosomenform überzuführen. Daß jedoch die Bewegung der Nährmedien nicht allein Ursache des Überganges in die Trypanosomenform bildet, zeigt der Umstand, daß ruhig stehende, besonders ältere Kulturen häufig kleine Trypanosomen enthalten. Von wesentlichem Einflusse auf die Form (Crithidia oder Trypanosoma?) scheint die innere Reibung des Mediums zu sein, in dem die Teilung stattfindet. Dünnflüssige Nährlösungen begünstigen das Vorkommen der Crithidiaform, halbflüssige bis zähe Medien bedingen Vorkommen und Teilung im Trypanosomenzustande. Wichtig dürften zum Beweise hierfür die intrazellulären Teilungen des Rattentrypanosomas in dem Epithel des Flohmagens sein, bei denen stets die Tochtertiere Trypanosomenform zeigen (MINCHIN und THOMSON 1911, NÖLLER 1912).

Damit sind unsere Kenntnisse von den Faktoren, die Vermehrung und Form der Trypanosomen bedingen, erschöpft. Wie erklären sich nun die großen protoplasmareichen gestreiften Riesenformen und wie die dünnen glatten breiten Formen mit länglichem Kerne somen in der Tat in hypotonischen Medien besser zu gedeihen und dadurch von den Trypanosomen der höheren Wirbeltiergruppen abzuweichen.

bei der chronischen Infektion des Froschtrypanosomas? Daß sie Überbleibsel einer jahrelang zurückliegenden Infektion darstellen, ist schon begründet worden. Auch ist schon erwähnt, daß beim Beginne von Rezidiven und unter günstigen Lebensbedingungen die Riesenform auftritt, beim chronischen Verlaufe dagegen und beim Laubfrosche stets die glatte Form mit dem gestreckten Kerne vorhanden ist. Die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung ist deshalb die, daß die protoplasmareiche Riesenform unter günstigen Ernährungsbedingungen auftritt, während die glatte protoplasmaarme flache Form die Hungerform der ungünstigen Lebensbedingung darstellt. Daß die Kaulquappenform an manche Fischtrypanosomen erinnern, ist deshalb interessant, weil die Kaulquappe ebenfalls ein Wasserleben führt, so daß der Schluß nicht unberechtigt ist, daß ihr Blut dem der Fische in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften gleicht. Leider liegen über Zusammensetzung und osmotischen Druck des Blutes bei Kaulquappen, Fröschen und Laubfröschen noch keine Untersuchungen vor, ebensowenig ist bekannt, ob das Blut hungernder und gefütterter Wasserfrösche voneinander Abweichungen zeigt.

Kultur und Entwicklung im Überträger.

Ich bin überzeugt, daß zur Erklärung der Vorgänge im Überträger die physikalisch-chemischen Verhältnisse vollkommen ausreichen.

Die Entwicklung im Überträger weicht bei den Trypanosomen dadurch von der Kultur ab, daß am Ende der Entwicklung aus den zunächst gebildeten Crithidien wieder kleine Trypanosomen entstehen. Welche Faktoren im chronischen Verlaufe von Infektionen die ersten Teilungen im Überträger anregen, ist noch unbekannt. ROBERTSON vermutet, daß die Verminderung des osmotischen Druckes es sei, die bei den Fischtrypanosomen im Egelmagen die Teilung hervorruft. Diese Ansicht erscheint zunächst sehr wahrscheinlich. Doch muß es dahingestellt bleiben, ob im Egelmagen zunächst eine Verminderung des osmotischen Druckes stattfindet. Allerdings spricht der Umstand, daß die Blutkörperchen aufquellen und daß Hämoglobin in Lösung geht, etwas zugunsten dieser Ansicht. Jedenfalls aber tragen auch viele andere Faktoren, so die durch die Spaltung und Lösung der Eiweißstoffe des Blutes bedingten Veränderungen dazu bei, daß die Trypanosomen bessere Ernährungsbedingungen vorfinden. Bemerkenswert erscheint mir die Tatsache, daß bei den großen

gestreiften und glatten Trypanosomen des Blutes erwachsener Frösche in *Hemiclepsis* keine Vermehrung stattfindet (Versuche mit 26 Egel), während diese Formen in Kultur sich vermehren. Es ist fraglich, ob die Ursache nur an der verminderten Teilungsenergie dieser alten Formen liegt oder ob das Kaulquappenblut, das von *Hemiclepsis* viel schneller zerlegt und verdaut wird als Blut erwachsener Frösche, infolge dieser schnelleren Verdaulichkeit günstigere Ernährungsbedingungen bietet. Übrigens steht diese Erscheinung nicht ganz einzig da. ROBERTSON hat beim *Trypanosoma gambiense* neuerdings im Verlaufe der Infektion periodische Schwankungen in der Größe der Trypanosomen gefunden und vermutet auf Grund ihrer Versuche, daß nur die kleineren Trypanosomen die Fähigkeit besitzen, sich in Glossinen zu vermehren. Auch hat man bei Übertragungsversuchen bei Ratten-trypanosomen mit Läusen und Flöhen dann die günstigsten Ergebnisse, wenn man frisch infizierte Ratten auf dem Höhepunkte der Infektion zur Fütterung der Überträger benutzt (BALDREY; eigene Erfahrungen). Diese letzteren Beobachtungen sprechen mit aller Schärfe gegen eine Analogie mit den Hämosporidien, da dort das infizierte Blut erst dann für den Überträger infektiös wird, wenn im späteren Laufe der Infektion geschlechtlich differenzierte Formen gebildet worden sind. Die Tatsache, daß manche Überträger erst nach einer kürzeren oder längeren Periode nach dem ersten Saugakte am infizierten Tiere die Fähigkeit zu infizieren erhalten, erklärt sich schon rein aus den anatomischen und mechanischen Verhältnissen. Solange die Trypanosomen beim Egel und bei den Glossinen die Rüsselscheide bzw. die Speicheldrüsen nicht erreicht haben oder solange sie bei den Flöhen noch nicht mit dem Kote ausgeschieden werden, fehlt ihnen jede Möglichkeit, in das Blut des Wirbeltierwirtes zu gelangen. Dieser Tatsache gegenüber sind die fehlgeschlagenen Versuche, durch Einspritzung von Darminhalt des Überträgers in der Zwischenzeit eine Infektion hervorzurufen, ohne großen Belang, da die Trypanosomen durch die Einspritzung ganz plötzlich in ein anderes Medium gebracht werden, an das sich anzupassen sie keine Zeit finden. Bei der natürlichen Übertragung dagegen nähern sich die Lebensbedingungen allmählich wieder denen im Wirbeltierwirt, so daß sogar ein Übergang in die Trypanosomenform stattfindet und mithin beim Einführen in den Wirbeltierwirt ein plötzlicher Übergang in ein fremdes Medium vermieden wird.¹⁾

¹⁾ Bei *Tryp. gambiense* ist es nach den Angaben von BRUCE und seinen Mitarbeitern (1911) und nach den neueren Versuchen von KLEINE und ECKARD nie

Bei den Kaulquappentrypanosomen in *Hemiclepsis* geschieht der Übergang in die Trypanosomenform schon im Magen bald nach Ablauf der ersten stürmischen Vermehrung. Der Magen des Egels wird allmählich leer; die Füllung der Rüsselscheide mit Sekret der Speichelzellen schließt an die fortschreitende Verdauung an. Ob die nun einsetzende Wanderung der Trypanosomen durch den Rüssel in die Rüsselscheide rein mechanisch durch Verengung des Magens, in dem das Epithel im Anschluß an die Verdauungsperiode proliferiert, oder durch chemotaktische Wirkung des Speichels zu erklären ist, bleibt dahingestellt; doch hat die letzte Annahme viel Wahrscheinlichkeit für sich.

Die Artenfrage.

Aus der Menge der meist ungenügend beschriebenen Amphibientrypanosomen lassen sich bis jetzt erst zwei mit Sicherheit herausheben:

1. Die kosmopolitische viel beschriebene Art

Trypanosoma rotatorium MAYER

aus *Rana esculenta*, *R. temporaria*, *R. limnocharis*, *R. tigrina*, *Leptodactylus ocellatus*, *Bufo viridis*, *Hyla arborea* und sicher aus zahlreichen weiteren Arten von Anuren.

Die Art zeigt bei frischer Infektion typische Trypanosomengestalt. Die gewöhnlich im Blute erwachsener Frösche vorkommenden Formen sind veränderte Überbleibsel einer jahrelang zurückliegenden Infektion. Die Übertragung geschieht durch den Rüsselegel *Hemiclepsis marginata* O. F. MÜLLER von Kaulquappe zu Kaulquappe. Die Entwicklung geht nur im Magen, nicht im Darm des Egels vor sich. Ob in anderen Gegenden noch andere Egel als Überträger wirken, ist noch zu untersuchen. Jedenfalls findet auch in den Tropen (Brasilien) die Infektion schon im Kaulquappenalter statt, da MACHADO junge Frösche schon sehr häufig infiziert fand.

Als sichere Synonyma für *Tryp. rotatorium* kommen in Betracht:

Tryp. costatum FRANÇA und ATHIAS.

Tryp. loricatedum FRANÇA und ATHIAS.

Tryp. hylae LEMMERMANN 1908, FRANÇA 1909.

Tryp. mega DUTTON und TODD. (Vgl. Nachtrag!)

Tryp. chattoni MATHIS und LEGER.

möglich, durch Einspritzung von Darminhalt infektiöser Glossinen eine Infektion zu erzeugen, während die Einspritzung der Speicheldrüsen-trypanosomen, welche der Blutform sehr ähnlich sind, eine Infektion verursacht.

2. Das in Mitteleuropa fehlende, scheinbar auf tropische und subtropische Gegenden beschränkte

***Trypanosoma inopinatum* SERGENT 1904**

aus *Rana esculenta* (Nordafrika, Portugal), *R. tigrina* und *R. hexidactyla* (Indien; PATTON).

Kleines, sich im Froschblute sehr stark vermehrendes Trypanosoma, das für den Wasserfrosch häufig ausgesprochen pathogen wirkt. Bei Fröschen, die die Infektion überstanden, können später etwas größere Formen im Blute auftreten. Die Übertragung erfolgt durch Egel, die auf erwachsenen Fröschen saugen und zwar durch *Helobdella algira* in Nordafrika und Portugal (BILLET, FRANÇA) und wahrscheinlich durch *Clepsina spec.* in Indien (PATTON). In *Helobdella* geht die Entwicklung dieses Trypanosomas in Magen und Darm vor sich (FRANÇA), und die Infektion kann auf die Nachkommen des Egels vererbt werden (BRUMPT). Synonyma für diese Art sind (nach FRANÇA):

Trypanosoma elegans FRANÇA und ATHIAS 1906.

Trypanosoma undulans FRANÇA und ATHIAS 1906.

Trypanosoma hendersoni PATTON 1908.

Von den zahlreichen weiteren ungenügend beschriebenen Trypanosomen aus anuren Amphibien dürften die meisten zu *Trypanosoma rotatorium* gehören; ob welche als selbständige Arten aufzufassen sind, läßt sich zurzeit noch nicht entscheiden. [*Tryp. nelspruitense* LAVERAN, *T. karyozeukton* DUTTON und TODD und *T. bocagei* MATHIS und LEGER u. a.]

II.

Gattung: ***Dactylosoma* LABBÉ 1894.**

Art: ***Dactylosoma ranarum* KRUSE.**

[= *Dactylosoma splendens* LABBÉ 1894 pr. p.]

Synonyme:

(*Drepanidium ranarum* (LANKESTER) KRUSE 1890).

Haemogregarina ranarum KRUSE 1890.

Haemogregarina ranarum (DANILEWSEKY) CELLI und SANFELICE 1891.

Laverania ranarum GRASSI und FELETTI 1892.

Dactylosoma splendens LABBÉ 1894 pr. p.

Drepanidium monilis LABBÉ 1894 pr. p.

Lankesterella monilis LABBÉ 1899.

Drepanidium ranarum (LANKESTER) LAVERAN 1899.

Laverania ranarum (KRUSE) LABBÉ 1899.

Lankesterella monilis (LABBÉ) HINTZE 1901, 1902.

Haemogregarina splendens (LABBÉ) SAMBON u. LOW 1902, FRANÇA 1908.

Unsicher: *Drepanidium* DURHAM 1902.

Falsch: *Lankesterella minima* (CHAUSSAT) HINTZE 1901, 1902.

Kurze Kennzeichnung.

Dactylosoma ranarum KRUSE bildet auf Grund meiner Untersuchungen eine Hämosporidienart mit folgenden Hauptmerkmalen:

Kleine, am Vorderende abgerundete, am Hinterende etwas verjüngte Merozoiten entwickeln sich innerhalb der Erythrocyten des Wasserfrosches entweder zu Schizonten oder zu Gameten. Die Schizonten bilden sich durch Vergrößerung und Abrundung des Parasiten, dessen Kernzahl sich auf 4—16 vermehrt. Die Kerne rücken an die Peripherie, um jeden grenzt sich ein Protoplasma-bezirk ab, und es entsteht eine rosettenförmige oder handschuhfingerartige Anordnung der einzelnen Merozoiten. Die Gameten entstehen durch Verlängerung und später meist hakenförmiger Umknickung des intrazellulären Parasiten. Vorderende des ruhenden, intrazellulären Gameten abgerundet, Hinterende verschmälert, so daß der gestreckte Parasit Keulenform zeigt. Beim Kriechen spitzt sich das Vorderende zu. Länge der Gameten ca. 10—15 μ . Kern ist ein Bläschenkern mit großem kompaktem Caryosome und deutlicher Kernsaftzone.

Viel größere Formen wie sie unter dem Namen *Drepanidium magnum*, *Haemogregarina magna* GRASSI und FELETTI und *Danilewskyia* LABBÉ beschrieben wurden, gehören nicht zu *Dactylosoma*.

Geschichtliches.

Höchst wahrscheinlich ist das bewegliche Gametenstadium des *Dactylosoma* schon vor 1890 von manchen Forschern gesehen worden, welche die GAULE'schen Würmchen beobachteten; doch mag allerdings den meisten jener Forscher zumeist nur *Lankesterella minima* CHAUSSAT vorgelegen haben. Als erster gibt KRUSE 1890 eine gute Beschreibung und gute Bilder des *Dactylosoma*, das er schlechthin als *Drepanidium ranarum* LANKESTER anspricht und für das er den Namen *Haemogregarina ranarum* einführen möchte. Er bildet sowohl die Schizogonie wie auch die Gametenform richtig ab (Fig. 6, 7, 8b)

und spricht sich für ihren Zusammenhang aus; er hält das Würmchenstadium für die am weitesten fortgeschrittene Entwicklungsstufe. Allerdings glaubt er auch die *Haemogregarina magna*, von der er in Fig. 8 a, 21 und 22 Bilder gibt, mit den kleineren Formen in Zusammenhang bringen zu müssen. Sehr gut hat KRUSE die Natur der stark lichtbrechenden Körner, die dem Parasiten sein Gepräge geben, untersucht. Er hat festgestellt, daß es sich um Tröpfchen einer leicht flüchtigen Fettsubstanz handelt, ein Ergebnis, das von späteren Beobachtern mit Unrecht angezweifelt wurde. Auch über eine interessante Reaktion des Wirtes auf die Infektion, nämlich das Vorkommen von Erythrocytenkernteilungen, hat er hingewiesen.

CELLI und SANFELICE geben ein Jahr später eine ebenso gute Beschreibung und gute Bilder von *Dactylosoma*, das sie nach KRUSE'S Vorschlag als *Haemogregarina ranarum* bezeichnen. Sie haben ebenfalls den Zusammenhang der Schizogonieförmigen („Sporulation“) mit der hakenförmigen und freien Gametenform, deren Form und Bläschenkern sie sehr deutlich abbilden, richtig erkannt. Doch beziehen sie ebenso wie KRUSE die *Haemogregarina magna* in den Entwicklungskreis des Parasiten ein. (Auf *Haem. magna* beziehen sich ihre Fig. 16—18 auf Taf. 5.)

GRASSI und FELETTI versuchen 1892 die intrazellulären Parasiten des Froschlutes voneinander zu trennen. Sie beschreiben das *Dactylosoma* unter dem Namen *Laverania ranarum*. Sie trennen richtig die *Haemogregarina magna* (Fig. 14 ihrer Tafel) unter dem Namen *Drepanidium magnum* als besondere Art ab. Ihnen hat auch Lankesterella minima vorgelegen, die sie als *Drepanidium ranarum* („Drepanidio piccolo“) bezeichnen und von der sie zwei Exemplare mit den charakteristischen Vacuolen abbilden (Fig. 15).

Freilich haben sie das „*Drepanidium ranarum*“ nicht von der Gametenform des *Dactylosoma* geschieden, sondern sie bestreiten die Zugehörigkeit jeglicher Würmchenform („Drepanidio piccolo“) zu den intrazellulären Formen. Daß es in Wirklichkeit zwei morphologisch verschiedene Arten der kleinen *Drepanidien* gibt, davon findet sich in ihrer Arbeit nichts.

Im Jahre 1894 erschien LABBÉ'S bekannte Arbeit über die intrazellulären Blutprotozoen der Wirbeltiere. LABBÉ trennt die ungeschlechtlichen Formen des *Dactylosoma* und die Gametenformen in zwei besondere Arten. Für die ungeschlechtlichen Formen schafft er den treffenden Namen *Dactylosoma splendens*. Die Gametenform beschreibt er als *Drepanidium monilis*. Das Verdienst seiner Arbeit

ist es, daß er die *Lankesterella minima* als *Drepanidium princeps* kennzeichnet und von den anderen Parasiten abgrenzt. Freilich bildet er dann für das *Drepanidium monilis* eine *Lankesterella*-Schizogonie ab (Taf. 3, Fig. 18, 19). Wenn auch die Arbeit noch *Dactylosoma*-Stadien in den Entwicklungskreis der „*Cytamoeba bacterifera*“ (Taf. 10, Fig. 24, 25, 26) einbezieht, so bietet doch die Fülle guter Beobachtungen und Abbildungen einen wesentlichen Fortschritt für die Kenntnis des *Dactylosoma* mitsamt seiner Gametenform („*Drepanidium monilis*“).

ZIEMANN gibt 1898 gute farbige Abbildungen und gute Microphotogramme von *Dactylosoma*-Schizonten aus italienischen Wasserfröschen. Die Bilder sind nach Präparaten hergestellt, die nach der Eosinazurmethode gefärbt waren.

LABBÉ behält 1899 in seiner Bearbeitung der Sporozoa die Trennung der Gametenform als *Lankesterella monilis* vom *Dactylosoma*, das er *Laverania ranarum* (KRUSE) em. LABBÉ nennt, bei.

HINTZE veröffentlicht 1901 bzw. 1902 seine Untersuchungen über *Lankesterella minima* CHAUSSAT, in dessen Entwicklungskreis er die *Dactylosoma*-Schizogonie einbezieht. In Wirklichkeit hat er aber *Dactylosoma* nur ein einziges Mal zu Gesicht bekommen („*Lankesterella monilis*“). Die meisten seiner recht mangelhaften Figuren (Trockenpräparate) beziehen sich auf *Lankesterella*. Die Schizogoniebilder, die er gibt, sind so spärlich und so schematisiert, daß ich vermute, sie stammen von zerflossenen *Lankesterella*-Exemplaren oder anderen Zellpartikeln. In meiner Vermutung werde ich durch HINTZE's falsche Angabe bestärkt, die betreffende angebliche „Schizogonie“ finde in den inneren Organen statt; auch weiß ich aus eigener Erfahrung, daß *Dactylosoma* in der Umgebung Berlins jedenfalls sehr selten ist, da ich es trotz angestrengten Suchens nicht einmal dort gefunden habe.

Im Jahre 1902 beschreiben SAMBON und LOW das *Dactylosoma* als *Haemogregarina splendens* aus Wasserfröschen der römischen Campagna (Referat).

DURHAM beschreibt in demselben Jahre das Vorkommen von *Dactylosoma* in einer kleinen Kröte aus Brasilien neben einem „*Drepanidium*“ (Referat).

BILLET versucht 1904 einen Zusammenhang zwischen *Dactylosoma* (das er unverkennbar und gut abbildet, aber fälschlich als *Drepanidium* bezeichnet) und dem *Trypanosoma inopinatum* SERGENT aufzufinden. Bemerkenswert ist, daß BILLET im Egel *Helobdella algira* keine Weiterentwicklung des *Dactylosoma* gefunden hat.

DUTTON, TODD und TOBEY beschreiben 1907 das *Dactylosoma*, von dem sie auch nach GIEMSA-Präparaten Abbildungen geben, aus dem Blute von *Rana galamensis* aus Gambia (Referat).

FINKELSTEIN gibt 1908 Abbildungen von *Dactylosoma* aus dem Blute von Wasserfröschen aus dem Kaukasus.

FRANÇA beschreibt 1908 das Vorkommen eines zweiten Kernes beim *Dactylosoma* („*Haemogregarina splendens*“). Die teilweise recht guten Abbildungen sind nach GIEMSA-Präparaten hergestellt. Sowohl die Schizogoniformen wie auch die beweglichen Formen werden dem Parasiten zugezählt, der infolge der vermeintlichen Doppelkernigkeit zu den Binucleaten gehören soll.

MATHIS und LÉGER geben 1911 eine brauchbare Beschreibung und farbige Abbildungen von *Dactylosoma* („*Haemogregarina splendens*“) nach GIEMSA-Präparaten aus dem Blute von *Rana Güntheri* aus Tonkin. Die Abbildungen beziehen sich durchgehend auf ungeschlechtliche Formen.

Unsicher ist die Angabe von BERESTNEFF (1903), der im Blute indischer Frösche „*Drepanidium monilis*“ gefunden hat. Da keine Beschreibung des Parasiten gegeben ist, läßt sich nicht entscheiden, ob BERESTNEFF *Dactylosoma* meint.

Nomenklatur.

Die richtige Benennung des Parasiten erfordert wegen seiner reichen Geschichte Schwierigkeit. KRUSE hat als erster 1890 den Parasiten sicher und gut beschrieben und als *Drepanidium ranarum* LANKESTER bezeichnet. Er schlägt vor, ihn lieber *Haemogregarina ranarum* zu benennen. Der Gattungsname *Drepanidium* muß fallen, weil er schon eher für ein Infusor vergeben wurde. Der Gattungsname *Haemogregarina* ist für die echten Hämogregarinen (Typus *H. stepanowi* DANIL.) beizubehalten, kommt also für unseren ganz verschiedenen Parasiten nicht in Betracht. Damit ist auch die Benennung durch CELLI und SANFELICE 1891 erledigt. Die nächste Benennung ist *Laverania ranarium* GRASSI und FELETTI 1892. Dieser Gattungsname muß als Gattungs- oder Untergattungsname für den Tropicaparasiten reserviert bleiben (vgl. DOFLEIN und KOEHLER, Überblick über den Stamm der Protozoen 1912). Deshalb ist auch LABBÉ's Bezeichnung *Laverania ranarum* (KRUSE) LABBÉ in Sporozoa, 1899 nicht richtig. Der Gattungsname muß vielmehr der ausführlichen Arbeit LABBÉ's 1894 entnommen werden. Die Bezeichnung *Drepanidium monilis* für die Gametenform muß fallen, da der Gattungs-

name *Drepanidium* vergeben ist. Dagegen ist der Gattungsname *Dactylosoma* LABBÉ 1894 anzuwenden, da der Parasit wegen seines Entwicklungsverlaufes und seiner morphologischen Merkmale in keiner der bekannten Hämosporidiengattungen untergebracht werden kann. Der Artnamen muß nach den zoologischen Benennungsregeln *ranarum* lauten, der Autornamen KRUSE. Die von HINTZE gebrauchte Bezeichnung *Lankesterella minima* CHAUSSAT ist falsch, da dieser Name für eine Hämogregarine beizubehalten ist, deren Morphologie und Vermehrung von *Dactylosoma* grundverschieden ist. Die Bezeichnungen *Drepanidium monilis* LABBÉ 1894, *Lankesterella monilis* LABBÉ 1899 und *Lankesterella monilis* LABBÉ bei HINTZE 1901, 1902 sind aufzugeben, da die unter diesen Namen als Art beschriebenen Formen nur die Gametenform des *Dactylosoma* vorstellen, also mit dem Vertreter der Gattung *Lankesterella* nichts zu tun haben. Der sehr bezeichnende Artnamen *splendens* LABBÉ 1894 ist aus Prioritätsgründen zu vermeiden. Die Benennung lautet also:

Gattung: *Dactylosoma* LABBÉ.

Art: *Dactylosoma ranarum* KRUSE.

Morphologie.

Lebendbeobachtung.

Alle Entwicklungsstufen von *Dactylosoma* sind ziemlich fest an das Leben im Erythrocyten gebunden. Der Parasit ist wie die Malariaerreger ein typischer Bewohner der Blutbahn.

Im frischen Blute fallen die Parasiten dadurch auf, daß sich an ihrer Stelle im Erythrocyten ein hellerer Bezirk befindet. Die hämoglobinführende Hülle des Erythrocyten ist, soweit der Parasit reicht, aufgelöst. Ob der Parasit innerhalb des Erythrocyten liegt und beide Wände auflöst, oder ob er einseitig in die Erythrocytenmembran eingelassen ist, läßt sich nicht mit Sicherheit unterscheiden. Häufig habe ich bei größeren Parasiten in auf der Kante stehenden Blutkörperchen ein geringes Übertreten auf beiden Seiten gesehen. Soweit der gelöste Bezirk in der Erythrocytenhülle reicht, reichen die Konturen des Parasiten. Das Protoplasma ist nahezu hyalin.

Es enthält bei fast allen Entwicklungsstufen stark lichtbrechende, glänzende, runde, bis ca. 0,5—1 μ große Körnchen oder besser Tröpfchen, die einem winzigen Öltröpfchen gleichen. Diese Körnchen finden sich bei den jüngsten Merozoiten meist einzeln, am häufigsten in den Schizonten vor Beginn der Aufteilung. Sie bilden im frischen Blute das auffälligste

Merkmal des Parasiten. Die jüngsten Merozoiten sind gerade bis kommaförmig, 2–3 μ lang und 1–1,5 μ breit. Ihr Vorderende ist schwach bis deutlich verdickt, ihr Hinterende verjüngt, meist aber abgerundet und nicht so deutlich zugespitzt wie bei den Piroplasmen. Der in der vorderen Hälfte liegende Kern ist im Leben nicht sichtbar. Manche Autoren haben wohl das einzelne glänzende Tröpfchen, das auch meist im Vorderende liegt, als Kern angesprochen. Die Merozoiten sind fast unbeweglich, so daß es mir im Leben nicht gelang, das Wachstum zu verfolgen. Beim Heranwachsen nimmt die Länge zu, allmählich tritt Verbreiterung und Abrundung ein. Bei den Schizonten beginnen dann an einer Seite oder nach allen Seiten hin kleine Hervorwölbungen sichtbar zu werden. Diese verlängern sich, und die glänzenden Tröpfchen verteilen sich auf die so entstehenden Merozoiten. Den Zerfall in die fertigen Schizonten habe ich im Leben nicht gesehen, doch bleibt jedenfalls kein Restkörper übrig, wie sich aus den Dauerpräparaten ergibt. Der Zerfall kann innerhalb des Erythrocyten erfolgen, doch kommt es auch vor, daß große Schizonten in das Serum hinausgelangen und erst dort die Merozoiten in Freiheit setzen. Die Zahl der beobachteten Merozoiten beträgt 4–16. Sie sind frei im Serum nicht selten anzutreffen. Ein Unterschied zwischen den beiden Formen der Schizogonie, wie er im gefärbten Präparate beschrieben werden wird, läßt sich an den lebenden Formen kaum feststellen. Der Durchmesser von Schizonten schwankt zwischen 4 bis höchstens 9 μ . Die Bildung der Gameten geschieht durch Streckung in die Länge. Wenn der Gamet eine Länge von 5–8 μ erreicht hat, pflegt beim Weiterwachsen eine Umknickung zu erfolgen, die gewöhnlich hinter dem Kerne einsetzt. Das Vorderende der geknickten („hakenförmigen“) Form bleibt abgerundet und breiter, das Hinterende ist verjüngt und ebenfalls abgerundet. Die beiden Schenkel sind im Leben bei dem intrazellulären Parasiten nicht immer deutlich voneinander zu unterscheiden. Der Kern ist groß geworden und bildet einen sehr deutlichen, ziemlich scharf begrenzten ovalen bis runden Fleck, der die ganze Breite des Parasiten ausfüllt. Er liegt meist etwas vor der Mitte. Diese Gameten bleiben unter dem Deckglase im sauber entnommenen Blute meist innerhalb der Erythrocyten liegen. Bei manchen erscheint die Knickungsstelle scharf abgestutzt. Ist das Präparat verunreinigt oder hat das Blut einige Minuten mit der Luft in Berührung gestanden, so strecken sich viele Gameten und nehmen eine typische Keulenform an. Viele kriechen nun aus den Erythrocyten heraus. Beim Kriechen spitzt sich das bisher keulenförmige Vorderende scharf zu

Die Fortbewegung geschieht schneller als bei *Lankesterella*. An dem verjüngten, aber abgerundeten Hinterende sind manchmal fädige Anhänge einer ausgeschiedenen Schleimspur deutlich wahrnehmbar. Beim Absterben, das im Präparate meist ziemlich schnell erfolgt, werden wellige Verdickungen sichtbar, wie sie LABBÉ schon beschrieben und abgebildet hat. Die Länge der gestreckten Form beträgt durchschnittlich 10—12 (—15) μ . Beim Kriechen können diese Formen Blutkörperchen durchdringen. So starke Deformierungen der Erythrocyten, wie sie NERESHEIMER abbildet, habe ich nicht gesehen. (NERESHEIMER glaubt dabei *Lankesterella* vor sich gehabt zu haben. Nach seinen Figuren, die in den Parasiten oft deutliche Körner und keine Vacuolen wiedergeben, handelt es sich eher um *Dactylosoma*.) Immerhin scheint der Parasit doch mit starken lösenden Fermenten für die Erythrocytenhülle ausgestattet zu sein, im Gegensatz zur *Lankesterella*, die innerhalb des Erythrocyten liegt, ohne das Hämoglobin aus der Hülle aufzulösen.

Beschreibung nach dem gefärbten Präparate.

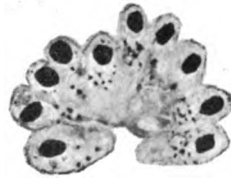
Zur einwandfreien morphologischen Untersuchung wurden nur in Sublimat oder Sublimatessig feucht fixierte und stets feucht weiterbehandelte Deckglasausstriche benutzt. Die besten Ergebnisse bot Färbung mit Hämalaun (entweder 20 Minuten ohne folgende Differenzierung oder Überfärben und Differenzieren in salzsaurem Alkohol). Sehr gute Präparate erzielte ich auch mit DELAFIELD'S Hämatoxylin, mit Karbolthionin (Überfärben und Differenzieren in den Alkoholstufen) und Boraxmethylenblau (Differenzieren in den Azeton-Xylolstufen).

Zuerst prüfte ich die Natur der glänzenden Körner. Sie verschwinden in Trockenpräparaten und nach Sublimatfixierung in den in Kanadabalsam oder Zedernöl eingebetteten Präparaten. Dagegen lassen sie sich durch Osmiumdämpfe fixieren und durch nachträgliches Einlegen in Osmiumsäurelösungen deutlich schwärzen, wie schon KRUSE gefunden hat, der die Tropfen deshalb für ein flüchtiges Öl ansprach. Die absprechenden oder zurückhaltenden Urteile späterer Untersucher (CELLI und SANFELICE, HINTZE) erklären sich wohl teilweise daraus, daß sie die Körnchen für Kerne hielten (CELLI und SANFELICE) oder sie gar nicht untersucht haben (HINTZE). Daß die Tröpfchen mit Kernen nichts zu tun haben, ergibt sich schon daraus, daß man in osmierten Präparaten nachträglich mit Hämalaun die Kerne darstellen kann, neben denen man dann noch die geschwärzten Tröpfchen sieht. Außerdem lassen sich die Körner in mit Osmium-

dämpfen fixierten Präparaten durch Sudan III in alkoholischer Lösung deutlich färben, eine Reaktion, die KRUSE'S Deutung noch mehr begünstigt.

Die jungen Merozoiten zeigen in den Präparaten einen kleinen, rundlichen scharf gefärbten Kern, um den sich oft deutlich eine unscharf abgegrenzte hellere Plasmazone wahrnehmen läßt. Ob dieser manchmal beobachtete helle achromatische Hof etwa noch zum Kerne gehört, läßt sich bei der Kleinheit des Objektes nicht entscheiden; doch ist das nicht unwahrscheinlich, da SCHUBERG und REICHENOW bei den Piroplasmen ähnliche Verhältnisse festgestellt haben. Unregelmäßige, winzige, stark gefärbte Körnchen finden sich in manchen Merozoiten, doch haben sie mit dem Kern nichts zu tun. Das Protoplasma ist fein wabig gebaut. In GIEMSA-Präparaten enthält es bei den heranwachsenden Merozoiten und Schizonten häufig staubförmige chromatisch gefärbte Körnchen eingelagert (Textfig. B).

Die Kernteilungen, die bei den heranwachsenden Schizonten stattfinden, erscheinen als einfache Durchschnürungen der vorher verlängerten, stark gefärbten Kernsubstanz. Manchmal bleibt zwischen den auseinanderweichenden Kernhälften ein Verbindungsfaden bestehen (Fig. 25). Nachdem einige Kernteilungen stattgefunden haben, lassen sich die Schizonten in zwei Gruppen einteilen. Bei den einen schreitet die Kernteilung fort, bis die endgültige Zahl der Kerne gebildet ist (Fig. 30—38). Dann ordnen sich die einzelnen runden Kerne vorwiegend nach einer Seite oder im Halbkreise an, das Protoplasma bildet um jeden Kern eine fingerförmige Vorwölbung. Beim Zerfall der einzelnen Merozoiten bleibt dann kein Restkörper übrig. Die Anordnung der Merozoiten erfolgt übrigens selten in einer Ebene, wie es in den Trockenpräparaten erscheint. In den Feuchtpräparaten sieht man sehr deutlich höher und tiefer gelegene Kerne und Merozoiten. Bei der zweiten Gruppe der Schizonten (Fig. 39 und 40) ordnen sich nach wenigen Kernteilungen längliche oft hantelförmige Kerne, die aussehen, als ob sie sich in Teilung befänden, an der Peripherie des runden Schizonten an. Dann bildet sich über jedem dieser Kerne eine breitere, knospenartig vorspringende Protoplasma-kappe. Diese Schizonten erinnern etwas an die bei der Zweiteilung der *Babesia*-Arten vorkommenden Knospungsvorgänge, nur daß bei *Dactylosoma* mehr Knospen (bis 6) gebildet werden. Der verbreiterte



Textfig. B.

Großer *Dactylosoma*-Schizont.
GIEMSA Trockenpräparat. 2700 \times .

Kern steht mit seiner Längsachse quer zu der Merozoitenrichtung. Leider ist es nicht möglich gewesen, festzustellen, ob etwa diese letzte Art der Schizogonie mit der Gametenbildung im Zusammenhange steht.

Die Bildung der Gameten geschieht durch Längswachstum junger merozoitenähnlicher Formen. Diese werden bei $1,5-3 \mu$ Breite zunächst ungefähr $5-8 \mu$ lang und knicken dann beim weiteren Wachstum in der hinteren spitzeren Hälfte um. Das umgebogene Ende legt sich eng an den vorderen Teil an. Der Kern, der meist in der vorderen Hälfte kurz vor der Mitte liegt, macht eine Umwandlung durch. Die jungen, noch kürzeren und schmalere Formen zeigen durchgehend einen kleinen $0,4-0,6 \mu$ im Durchmesser haltenden, stark gefärbten Binnenkörper (Caryosom) und um diesen einen deutlichen, mehr oder weniger scharf begrenzten hellen Hof (Kernsaftzone). Diese Kernstruktur gleicht noch ganz der der Merozoiten. Dann tritt eine deutliche Scheidung ein. Die eine Gruppe der Gameten behält diesen Kern mit dem kleinen scharf gefärbten Caryosome auch beim späteren Wachstum nach der Umknickung bei, und zwar zeigen diese Gameten häufig eine schlankere Form (Fig. 41—45). Bei der anderen Gruppe (Fig. 46—54) wird der Binnenkörper bedeutend größer. Er erreicht einen Durchmesser von $0,8-1,5 \mu$, ja wenn er oval ist, im Längsdurchmesser sogar 2μ . Er blaßt etwas ab, was besonders in Hämalaunpräparaten deutlich hervortritt. Die Kernsaftzone umgibt den deutlich runden bis ovalen Binnenkörper auf allen Seiten. Sie ist gegen das Protoplasma so scharf abgegrenzt, daß die Annahme einer Kernmembran nötig ist. Das wesentlichste Merkmal dieser Form bildet ein bei fast jedem Exemplare vorhandener stark färbbarer Körper, der der Kernmembran vorn oder seitlich aufliegt. Seine Gestalt ist unregelmäßig, meist etwas länglich. Er färbt sich mit Hämalaun so stark im Chromatintone, daß er selbst in Präparaten, in denen die Caryosome durch starkes Differenzieren ganz abgeblaßt sind, noch eine tief schwarzblaue Färbung beibehält. Er liegt stets im Protoplasma des Parasiten unmittelbar auf der Kernmembran. Einen Austritt auf die Oberfläche des Parasiten habe ich nie beobachtet. Wie dieser Körper entsteht, läßt sich bei der Kleinheit des Parasiten schwer sicher feststellen, doch erscheint es mir wahrscheinlich, daß er durch Chromatinaustritt aus dem Binnenkörper entsteht. Einmal fand ich eine Form, in deren Kerne dem blassen Binnenkörper auf einer Seite ein intensiv gefärbter Chromatinbrocken aufsaß (Fig. 51). Selten liegen der Kernmembran mehrere kleinere Körner auf (Fig. 52).

Was die Deutung dieser Befunde anlangt, so sind wahrscheinlich (in Analogie mit anderen Formen) die langgestreckten Formen mit dem kleinen Caryosome als die männlichen, die mit dem größeren chromatinärmeren Binnenkörper und dem der Kernmembran aufliegenden Chromatinkörper als die weiblichen Gameten anzusprechen. Der Chromatinkörper ist dann am leichtesten als eine Reduktionserscheinung zu begründen. Ähnliche Verhältnisse hat SCHAUDINN bei der Reifung des Macrogametocyten des *Plasmodium vivax* beschrieben und abgebildet. Auch bei *Haemoproteus* und *Leucocytozoon* ist das Vorkommen ähnlicher Chromatinbrocken bekannt. Die ähnlichen bei manchen Hämogregarinen oft beschriebenen Gebilde liegen in der Regel auf der Oberfläche des Parasiten (REICHENOW, WOODCOCK). Bei *Dactylosoma* ist es jedenfalls vor allem dieses Chromatinkorn gewesen, das FRANÇA 1908 dazu führte, den Parasiten den Binucleaten im Sinne HARTMANN'S zuzuzählen. Daß dieser Körper jedoch mit einem Blepharoplasten nichts zu tun hat, zeigt schon seine unregelmäßige Gestalt.

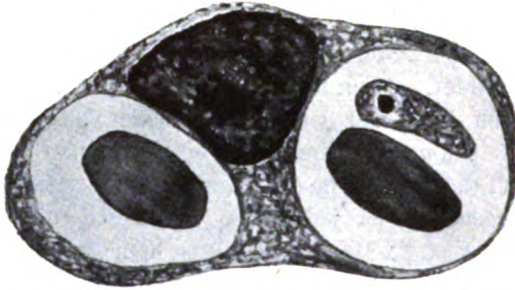
Daß die von mir als Gameten beschriebenen Formen wirklich in den Zeugungskreis des *Dactylosoma* hineingehören, ergibt sich schon daraus, daß ich alle Übergänge gefunden habe. Außerdem habe ich im Laufe der letzten drei Jahre wohl 400 Wasserfrösche auf Blutparasiten untersucht. Nur in den drei Fällen, in denen ich die *Dactylosoma*-Schizogonie fand, waren auch die Gametenformen vorhanden. Außerdem sind in zwei gelungenen Infektionsversuchen mit *Dactylosoma* später auch die beschriebenen Gameten im Blute der infizierten Frösche aufgetreten.

***Dactylosoma* im Organismus des Wirtes.**

Wie schon erwähnt, ist *Dactylosoma* gleich dem Tertianaparasiten ein echter Bewohner der peripheren Blutbahn. Alle Entwicklungsstufen kommen im Blute des infizierten Frosches zugleich vor, so daß man aus einem einzigen Deckglausstriche alle in der Arbeit niedergelegten morphologischen Angaben entnehmen kann. In Leucocyten habe ich den Parasiten nicht angetroffen. Doch ist das häufige Vorkommen von Kernteilungsfiguren in Leucocyten (oder Hämatoblasten?) bei den infizierten Fröschen im peripheren Blute auffällig. Eine Kernteilungsfigur eines Erythrocyten habe ich nur einmal bei einem infizierten Frosche gesehen, während das KRUSE (1890) und LABBÉ (1894) häufiger beobachtet haben.

Da der Parasit die Fähigkeit der Hämoglobinauflösung besitzt, untersuchte ich die inneren Organe des einzigen infizierten Wasser-

frosches, der nicht zugleich mit *Lankesterella* infiziert war, auf das Vorhandensein von Blutpigment in Leber, Milz und Knochenmark. Zu meinem Erstaunen zeigte der Frosch aber keinerlei Vermehrung des Pigmentgehaltes. Die Leber war sogar außerordentlich arm an Melanin und Hämosiderin. Die Milz dagegen bot ein interessantes,



Textfig. C. Makrophag (Endothelzelle) aus der Milz mit zwei aufgenommenen Erythrocyten. DELAFIELD. 2700 X.

bisher lediglich von den Hundepiroplasmen (NUTTALL, GRAHAM SMITH, SCHUBERG und REICHENOW) bekanntes Phänomen: die großen

Milzendothelien zeigten häufig phagocytierte, mit *Dactylosoma* behaftete Erythrocyten in ihrem Innern (Textfig. C). Der Froschorganismus

geht also in der Milz in derselben radikalen Weise vor wie der Organismus des Säugetieres im peripheren Blute, um die intrazellulären Blutparasiten zu vermindern.

Infektionsversuche.

Mit dem Blute eines infizierten Frosches spritzte ich einige Kaulquappen des Wasserfrosches intraperitoneal; doch erfolgte keine Infektion. Erwachsenen Wasserfröschen habe ich mehrmals kleine Dosen (einige Tropfen) intravenös und intraperitoneal eingespritzt, ohne daß eine Infektion eintrat.

Am 8. XII. 12 tötete ich einen nur mit *Dactylosoma* infizierten Wasserfrosch, zerpupfte dessen Leber in physiologischer Kochsalzlösung und spritzte zwei erwachsenen Wasserfröschen, von denen der eine eine schwache Infektion mit *Lankesterella* zeigte, der andere parasitenfrei war, je 1 ccm der dicken Leberaufschwemmung intraperitoneal ein. Am 15. und 18. XII. zeigte einer der Frösche ganz wenige, kleine Merozoiten von *Dactylosoma*. Dann fand ich längere Zeit im Blute der Frösche nichts mehr. Eine spätere Untersuchung am 8. II. 13 zeigte aber, daß beide Wasserfrösche, auch der mit *Lankesterella* infizierte, eine *Dactylosoma*-Infektion davongetragen hatten. Neben allen Stadien der Schizogonie fand ich am 9. II. 13 schon erwachsene Gameten.

Die Versuche, den natürlichen Überträger des *Dactylosoma* zu

ermitteln, sind bisher fehlgeschlagen. Ich habe nur festgestellt, daß *Hemiclepsis* höchstwahrscheinlich nicht in Frage kommt. Ungefähr 30 junge Egel dieser Art sogen sich an dem nur mit *Dactylosoma* infizierten Frosche voll, der im Blute reichlich Gametenformen zeigte. Einige davon wurden später zerzufft und untersucht, jedoch ohne Ergebnis. Die Mehrzahl wurde gruppenweise in Abständen bis zum Ablaufe eines Monats fixiert und in gefärbten Serienschnitten untersucht. Weder im Darmkanal noch im Blutgefäßsystem noch in den Speichelzellen ließ sich etwas auffinden, das als Entwicklungsform hätte angesprochen werden können. Höchstwahrscheinlich ist die Karpfenlaus (*Argulus foliaceus* L.) der Überträger dieses interessanten Parasiten.

Eine Infektion bei Wasserfrosch-Kaulquappen habe ich noch nicht gefunden, doch habe ich auch noch keine genügend große Anzahl untersucht.

Systematische Stellung.

Daß *Dactylosoma* mit den Hämogregarinen (*Lankesterella*) nichts zu tun hat, geht aus der Beschreibung zur Genüge hervor. Der Verlauf der Schizogonie zwingt uns, den Parasiten bei den Hämosporidien im engeren Sinne unterzubringen. Eine Einreihung in eine der bekannten Gattungen *Plasmodium*, *Proteosoma*, *Haemoproteus*, *Haemocystidium* und *Babesia* oder in deren Untergattungen ist unmöglich. *Dactylosoma* ist vielmehr als selbständige Gattung zwischen *Plasmodium* und *Babesia* zu stellen. Dem *Plasmodium* ähneln die eine Schizogonie und einige cytologische Verhältnisse bei den Gameten bzw. Gametocyten. Für eine Verwandtschaft mit den Piroplasmen (Gattung *Babesia*) spricht vielleicht etwas die ziemlich feste Gestalt der jungen Merozoiten und das Vorkommen von Knospung bei der Schizogonie. In welcher Reihenfolge die Hämosporidien-gattungen aufzustellen sind, läßt sich zurzeit noch nicht entscheiden, da nur von *Plasmodium*, *Proteosoma* und *Haemoproteus columbae* der Zeugungskreis lückenlos bekannt ist. Der einzige sichere Vertreter unserer Gattung ist *Dactylosoma ranarum* KRUSE (1890). Eine zweite Art ist wahrscheinlich das unsichere *Dactylosoma tritonis* FANTHAM 1905 („*Lankesterella*“ *tritonis*) aus *Triton cristatus*.

Geographische Verbreitung und Wirtstiere.

Aus den Tropen liegen über *Dactylosoma ranarum* sichere Beobachtungen vor von DUTTON, TODD und TOBEY, die den Parasiten in *Rana galamensis* aus Gambia beschreiben, und von MATHIS und LÉGER,

die *Dactylosoma* einmal im Blute von *Rana Güntheri* aus Tonkin gefunden haben. Unsicher sind die Angaben von BERESTNEFF, der in Indien in *Rana tigrina* und *Rana limnocharis* „*Drepanidium monilis*“ gefunden hat, aber nicht mitteilt, was er unter *Drepanidium monilis* versteht. DURHAM scheint im Blute einer brasilianischen Kröte *Dactylosoma* neben einer Hämogregarine gesehen zu haben (Arbeit dem Verf. nur aus Referat bekannt). In Algier hat BILLET das *Dactylosoma* im Wasserfrosche (*Rana esculenta*) beobachtet, im Kaukasus FINKELSTEIN in demselben Wirte. Ebenfalls aus dem Wasserfrosche berichten sein Vorkommen alle folgenden Forscher: KRUSE (Neapel), GRASSI und FELETTI (Catania), ZIEMANN (Italien), CELLI und SANFELLE, SAMBON und LOW (aus der römischen Campagna), FRANÇA (aus Portugal), LABBÉ (aus Frankreich). In Deutschland hat HINTZE einen Fall verzeichnet, in dem er die Gametenform des *Dactylosoma* gesehen hat. Vermutlich stammte der betr. Frosch aus der Umgebung Berlins. Ich habe den Parasiten in der Umgebung von Berlin nicht auffinden können; in Thüringen fand ich 1912 unter 109 Wasserfröschen drei mit *Dactylosoma* infizierte, von denen zwei außerdem noch mit *Lankesterella* infiziert waren. Wie LABBÉ muß auch ich darauf hinweisen, daß *Dactylosoma* bei uns viel seltener aufzufinden ist als *Lankesterella minima* CHAUSSAT.

III.

Lankesterella minima CHAUSSAT 1850

emend. HINTZE 1902.

Synonyma.

Anguillula minima CHAUSSAT 1850.

Drepanidium ranarum LANKESTER 1871, 1892.

„Würmchen“ GAULE 1880, 1881, 1886.

„Cytozoen“ BÜTSCHLI 1882.

Drepanidium ranarum (LANKESTER) WALLERSTEIN 1882.

Drepanidium princeps LABBÉ 1894.

„*Drepanidio piccolo*“ pr. p. GRASSI und FELETTI 1892.

Lankesterella ranarum LABBÉ 1899.

Haemogregarina minima (LAVERAN) MATHIS und LEGÉR 1911.

Geschichtliches und Benennung.

Wie HINTZE (1901, 1902) nachgewiesen hat, stammt die erste Beschreibung der *Lankesterella minima* aus dem Jahre 1850 von dem

Arzte CHAUSSAT. Dieser gibt an, er habe im Froschblute sehr deutlich ein kleines Tierchen gesehen, das er *Anguillula minima* benennt, wohl weil er es für einen Nematoden hielt. Er ist überzeugt, daß es sich um einen Parasiten handelt. Auf seiner Tafel 2 gibt er in Figur 5 drei Abbildungen des Tieres. Die Exemplare messen bei Vergleich mit dem beigefügten Maßstabe 12—13 μ in der Länge, sind sichelförmig gebogen, an beiden Enden verjüngt und tragen an ihrem Hinterende einen hellen vakuolen- oder ringartigen Anhang. Das untere Exemplar läßt in der Mitte Andeutungen eines Kernes sehen. Obgleich die für *Lankesterella* so typischen beiden Vakuolen neben dem Kerne nicht abgebildet sind, besteht kein Zweifel darüber, daß CHAUSSAT derselbe Parasit vorlag, den HINTZE untersuchte und für den LABBÉ 1894 den Namen *Drepanidium princeps* brauchte. Die schwach sichelförmig gekrümmte Form und die gleichmäßige Verjüngung an beiden Enden sprechen für *Lankesterella* und gegen die Gametocyten von *Dactylosoma*.

Die Literatur über die älteren Beschreibungen von LANKESTER und die merkwürdigen GAULE'schen Ansichten ist bei HINTZE (1901, 1902) und bei LABBÉ (1894) zusammengestellt und referiert, so daß es sich für mich erübrigt, darauf einzugehen. Ich will nur versuchen, festzustellen, welchen Autoren die echte *Lankesterella minima* mit ihren zwei Vakuolen und mit der großen Beweglichkeit vorgelegen hat. LANKESTER hat sicher schon 1871 den Parasiten vor sich gehabt, weil er 1880 in von GAULE geschickten Fröschen denselben Parasiten wiedererkannte. Daß GAULE wohl in allen Fällen, oder doch in der großen Mehrzahl *Lankesterella minima* beobachtete, zeigen schon seine Figuren, die teilweise die beiden Vakuolen deutlich zeigen; es ist auch aus seinen Angaben über die Häufigkeit des Parasiten in der Umgegend von Leipzig, in der *Dactylosoma* wie überall nördlich der Alpen jedenfalls recht selten ist, zu entnehmen. Ebenso beweisen die Angaben über die lebhafteste Beweglichkeit der „Würmchen“, daß es sich um *Lankesterella* gehandelt hat, denn die *Dactylosoma*-Gametocyten sind zwar unter manchen Umständen auch beweglich, aber viel seltener in Bewegung zu beobachten. Auch sterben sie im Gegensatz zu der *Lankesterella* meist außerhalb der Erythrocyten sehr bald ab. BÜTSCHLI bildet in BRONN's Klassen und Ordnungen des Tierreiches 1889 typische *Lankesterella*-Exemplare mit den beiden Vakuolen ab. KRUSE dagegen hat 1890 nur Stadien von *Dactylosoma* (Schizonten, intrazelluläre und freie Gametenformen) und die größere *Haemogregarina magna* GRASSI und FELETTI abgebildet und beschrieben. Das Gleiche gilt von CELLI und SANFELICE 1891, die noch auf die geringe Be-

weglichkeit ihrer Parasiten hinweisen. GRASSI und FELETTI 1892 bilden zwar unzweifelhaft zwei Exemplare von *Lankesterella minima* als *Drepanidium ranarum* ab, bestreiten aber, daß zu *Dactylosoma* („*Laverania*“) überhaupt ein Würmchenstadium gehört. Sie haben deshalb ohne Frage *Dactylosoma*-Gametenform und *Lankesterella minima* zusammengeworfen als ihr „*Drepanidio piccolo*“; über dessen Kernbau und über dessen Vakuolen machen sie keine Angaben.

LABBÉ erkannte 1894 die *Lankesterella minima* als eigene Art und benannte sie *Drepanidium princeps*. Er schied sie infolge des Besitzes der beiden Vakuolen scharf von der Gametenform des *Dactylosoma*, die er bekanntlich *Drepanidium monilis* taufte. Die Arbeit bringt morphologisch außerordentlich scharfe Beschreibungen der Gestalt- und Kernverhältnisse, und hat auch die Vermehrungsweise durch Bildung von Cysten (Schizonten in membranartiger Hülle) richtig erkannt, ja die Angaben über die Schizogonie sind so reichhaltig, daß sie erst neuerdings und nur teilweise ergänzt und wieder bestätigt werden konnten (NÖLLER 1912, 1913), ein Umstand, der zweifellos mit den günstigen klimatischen Verhältnissen zusammenhängt, unter denen LABBÉ seine Untersuchungen ausführte. Freilich enthält die Arbeit LABBÉ's auch einige Verwechslungen; sie bildet für den *Lankesterella*-Gameten („*D. monilis*“) als angebliche Vermehrungsform eine zweifellose *Lankesterella*-Schizogonie ab (Tafel 3, Fig. 18, 19). Erst sieben Jahre später (1901, 1902) erschien HINTZE's Arbeit über *Lankesterella minima*, die die Kenntnisse über diesen Parasiten nicht fördert, sondern durch schwere Verwechslungen zu ganz falschen Schlüssen kommt. Wie schon im geschichtlichen Teile von *Dactylosoma* erwähnt, versuchte HINTZE die *Dactylosoma*-Schizogonie als ungeschlechtliche Vermehrung in den Entwicklungskreis von *Lankesterella* einzubeziehen. Daß seine auf die *Dactylosoma*-Schizogonie bezüglichen Angaben und Figuren überhaupt nur schematische Zeichnungen nach verschwommenen, trocken fixierten *Lankesterella*-Exemplaren oder nach Zellerfallsprodukten hergestellt sind, ergibt sich schon aus folgenden falschen Angaben: 1. Die Schizonten sollen sich vorwiegend nur in den inneren Organen finden; 2. die Angaben KRUSE's über die glänzenden Tröpfchen sollen nicht zutreffen; dazu kommt, daß HINTZE die von LABBÉ beschriebene Schizogonie in membranartiger Cyste anzweifelt und nicht gefunden hat, ein Umstand, der bei dem ungünstigeren Klima Berlins und den biologischen Bedingungen, die die Schizogonie hervorrufen, mich nicht verwundert. Daß HINTZE außerdem nur einmal eine *Dactylosoma*-Infektion gesehen hat, ist schon unter *Dactylosoma* besprochen

worden. Ebenso unglücklich verlief HINTZE's Versuch, eine Befruchtung zu konstruieren und die im Darms gefundene „Cysten“ als Sporogoniestadien zu *Lankesterella* zu ziehen. Die „Cysten“ bzw. die „Sporozoiten“ sind weiter nichts als „Schizonten“ bzw. Merozoiten von *Eimeria prevoti*, die in der Umgebung Berlins ein häufiger Parasit der Wasserfrösche ist. Doch gebührt HINTZE das Verdienst, daß er CHAUSSAT als Entdecker der *Lankesterella* ausfindig gemacht hat und dem Parasiten den zoologisch richtigen Namen *Lankesterella minima* CHAUSSAT gegeben hat.

DURHAM versuchte 1902 ebenfalls, die in einer brasilianischen Kröte gefundenen *Dactylosoma*-artigen Parasiten in den Zeugungskreis eines „*Drepanidium*“ einzubeziehen. Leider war mir DURHAM's Arbeit nicht im Originale zugänglich, so daß ich nicht beurteilen kann, ob DURHAM das *Dactylosoma ranarum* und die *Lankesterella minima* vor sich hatte. Doch erscheint es mir höchst wahrscheinlich, daß DURHAM unter seinem „*Drepanidium*“ irgendeine andere echte Hämogregarine gesehen hat, besonders weil er als dessen Überträger eine Zecke (*Ixodes*) ermittelt hat; Zecken kommen aber als *Lankesterella*-Überträger schon deshalb schwerlich in Betracht, weil auf dem Wasserfrosche im Norden Zecken wohl kaum vorkommen dürften.

Daß sich der Versuch BILLET's, 1904 einen Zusammenhang zwischen „*Drepanidium*“ und *Trypanosoma inopinatum* zu konstruieren, nicht auf *Lankesterella*, sondern auf *Dactylosoma* bezieht, ist dort schon klargestellt worden.

SEITZ machte 1910 den Versuch, an mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbten Exemplaren von *Lankesterella minima* eine Doppelkernigkeit nachzuweisen. Wie ich nachgewiesen habe (NÖLLER 1912), betrachtete er die nach HEIDENHAIN stark färbbaren Vakuolen als Kerne (Hauptkern und Blepharoplast) und übersah den wirklichen Kern ganz.

REICHENOW glaubt 1912 in seiner Bearbeitung der Hämogregarinen in PROWAZEK's „Handbuch der pathogenen Protozoen“ an der Zugehörigkeit des *Dactylosoma* und der von HINTZE gefundenen Darmcysten noch festhalten zu sollen. Er vermutet, die *Dactylosoma*-Schizogonie stelle die Gamogonie dar, die von LABBÉ 1894 und NÖLLER 1912 beschriebene Schizogonie sei als Agamogonie aufzufassen.

Morphologie.

Während fast des ganzen Jahres finden sich bei *Lankesterella*-Infektion nur die bekannten und viel beschriebenen beweglichen

„Würmchen“ im peripheren Blute und in den inneren Organen. Die Würmchen liegen teils gestreckt, teils zusammengeknickt innerhalb der unversehrten Erythrocytenhülle. Eine Auflösung des Hämoglobins findet im Gegensatze zu *Dactylosoma* nicht statt. Deshalb sind auch die intrazellulären *Lankesterella*-Exemplare viel schwerer zu sehen als *Dactylosoma*. Der Kern liegt ganz oder nahezu in der Mitte. Er ist an den lebenden Exemplaren als ein rundlicher bis ovaler hellerer Fleck deutlich sichtbar. Jederseits neben ihm liegt je eine der für *Lankesterella* so charakteristischen Vakuolen, die als grünliche, schwach glänzende Kugeln erscheinen und die im Erythrocyten das Auffinden des Parasiten erleichtern. Daneben finden sich im Protoplasma häufig noch viele kleinere Körnchen. Im sauber entnommenen Blute bleibt *Lankesterella* lange Zeit unbeweglich innerhalb der Erythrocyten liegen. Bei Hinzutreten von Hautsekret und anderen Flüssigkeiten erfolgt das Ausschlüpfen sofort. Die umgeknickten Formen, um die bei günstigem Lichte ein Art feiner Hülle da sichtbar wird, wo die beiden Enden aneinander liegen, strecken sich sofort und verlassen den Erythrocyten, an dem keine Verletzung sichtbar wird. Beim Kriechen behält der Parasit im Gegensatze zu den *Dactylosoma*-Gameten häufig seine schwach sichelförmig gebogene Gestalt bei. Beide Enden bleiben zugespitzt oder doch stark verjüngt. Die Bewegung erfolgt oft nicht ganz geradlinig, sondern in schwachem Bogen. Die Länge der erwachsenen Würmchen beträgt 10—13 μ im Durchschnitt. In der Milz und in der Leber findet man im Sommer häufiger kleinere und plumpere, noch nicht lebhaft bewegliche Exemplare (Merozoiten), die aus der Schizogonie hervorgegangen sind. Sie zeigen 7—8 μ Länge und oft noch keine oder nur eine deutliche Vakuole.

Zur Färbung eignet sich für die stets feucht fixierten Blut-, Milz- und Leberausstriche in erster Linie Hämalaun und DELAFIELD'S Hämatoxylin, dann auch Boraxmethylenblau mit Acetondifferenzierung. Das HEIDENHAIN'SCHE Eisenhämatoxylin färbt die Vakuolen so intensiv schwarz, daß der Kern beim Ausdifferenzieren schon längst entfärbt ist, ehe Einzelheiten sichtbar werden. Im gut gefärbten Präparate zeigt das Protoplasma eine ziemlich feinwabige, gleichmäßige Struktur. Die vordere Hälfte zeigt besonders an der Spitze in Feuchtgiemspräparaten feine rötliche Einlagerungen. Die Vakuolen sind als runde, helle Bezirke sichtbar. Der Kern besteht aus einer ovalen bis runden Hülle von Außenchromatin, das in kleinen, unregelmäßigen Brocken an der Peripherie angelagert ist, und zeigt in seiner Mitte fast stets einen deutlichen, aber unregelmäßigen Chromatin-

brocken, der in Gestalt und Größe nicht von den Brocken des Außenchromatins abweicht (Fig. 55—61). Die Kernstruktur stimmt aufs beste mit der von ROBERTSON bei *Haemogregarina nicoriae* beschriebenen überein.

Die Stadien der Schizogonie sind nur selten und nur unter bestimmten Bedingungen zu beobachten. Die von LABBÉ beschriebene Schizogonie, bei der der Parasit innerhalb der Erythrocyten in nur wenige große Merozoiten zerfällt, habe ich trotz mehrjähriger Suche nicht auffinden können. Ihre Existenz deshalb anzuzweifeln wäre verkehrt, da LABBÉ zweifellos unter klimatisch viel günstigeren Bedingungen seine Befunde erhob, ein Umstand, der die Häufigkeit der von ihm gesehenen Schizogoniestadien erklärt. Die Schizogonie bei neuer Infektion, die LABBÉ noch nicht mit Sicherheit beobachtet hatte, habe ich 1912 beschrieben. Der Parasit wächst in Leukozyten und Endothelzellen zu bohnenförmigen, grob wabig gebauten, ungefähr 28μ langen und $10-12 \mu$ breiten von einer deutlichen, membranartigen Hülle heran. Die Kerne vermehren sich bis auf 32, ordnen sich dann in zwei Reihen nach den Polen zu oder halbkreisförmig an; es bilden sich um sie fingerförmig abgegrenzte Protoplasmabezirke, und es entstehen um einen Restkörper bis 32 noch verhältnismäßig große Merozoiten von $5-8 \mu$ Länge. Das Vorderende zeigt schon im Schizonten eine Vakuole. Die zweite, hinter dem Kerne liegende Vakuole wächst erst nach.

Im Sommer 1912 ist es mir endlich bei einigen Wasserfröschen gelungen, die von LABBÉ beschriebene Schizogonie, bei der sehr viele und bedeutend kleinere Merozoiten gebildet werden, aufzufinden. Doch habe ich diese Schizogonie nie in den Erythrocyten des peripheren Blutes, sondern stets nur in hämoglobinfreien Zellen (Endothelien, Makrophagen) oder außerhalb der Zellen in den inneren Organen (Milz, Leber) aufgefunden. Die allerjüngsten Stadien sind rund, zeigen regelmäßig feinwabig gebautes Protoplasma und in der Mitte einen kompakten, runden Kern (Fig. 62—63). Ihr Durchmesser beträgt $6-8 \mu$. Eine Membran scheint in Bildung begriffen zu sein, wie sich aus den scharfen Konturen ergibt. Die Schizonten vergrößern sich nun bedeutend, wobei sie sich etwas in die Länge strecken. Eine deutlich doppelt konturierte Membran wird sichtbar. Das Protoplasma zeigt unregelmäßige Wabenstruktur und zahlreiche eingelagerte, färbare Reservestoffkörner. Der Kern wird lockerer und zerfällt durch aufeinanderfolgende Zweiteilungen in zahlreiche immer kleinere Tochterkerne (Fig. 64—66), die zuletzt oft nur noch aus einigen Chromatinbrocken zusammengesetzt sind. Bei der Kern-

teilung lassen sich bei der Kleinheit der Tochterkerne weitere Feinheiten nicht wahrnehmen. Die nun gebildeten kleinen Merozoiten sind meist unregelmäßig in dem ganzen Schizonten um den Restkörper angeordnet (Fig. 67, 68). Ihre Zahl mag schätzungsweise oft 50—60 betragen. Die ausgewachsenen Schizonten messen 16—20 μ in der Länge und 10—14 μ in der Breite. Die einzelnen Merozoiten haben eine Länge von durchschnittlich 4—6 μ bei einer Breite von 0,8—2 μ .

LABBÉ hat 1894 eine Isogamie im Froschblute beschrieben. Mir ist es bisher nie gelungen, im Froschblute einen ähnlichen Prozeß im Leben zu verfolgen. Dagegen habe ich in der Milz häufig zwei aneinanderliegende „Würmchen“ (Merozoiten) gesehen, um die manchmal sogar eine dünne Hülle deutlich wahrnehmbar ist (Fig. 61). Doch wage ich nicht, diese Formen als Oocysten anzusprechen, da ich bisher keine Kernverschmelzung habe finden können. Immerhin sei das Vorkommen solcher Stadien erwähnt, da auch bei brasilianischen Schlangenhämogregarinen von HARTMANN u. CHAGAS ähnliche Formen abgebildet worden sind.

Situs und Vermehrung der *Lankesterella* im Wasserfrosche.

Während der kühlen Jahreszeiten sind in unseren Gegenden im gesamten Organismus des Wasserfrosches nur die langen, beweglichen „Würmchen“ anzutreffen, deren Deutung als Gametenformen auch deshalb unbedingt erforderlich ist, weil es mit ihnen unmöglich ist, durch intravenöse, intraperitoneale Injektion oder Verfütterung (von Blut, Milz oder Leber) bei nicht infizierten Fröschen eine Infektion zu erzeugen (ich habe über 50 Versuche ausgeführt). Nur im Mai und Juni finden sich in den inneren Organen (vor allem in der Milz) heranwachsende Schizonten der Rezidivschizogonie, und im Juli, wenn die Temperatur am höchsten zu steigen pflegt, treten plötzlich die Rezidive mit solcher Gewalt ein, daß Milz, Leber, Lunge und Knochenmark geradezu von Schizonten überschwemmt sind. Im peripheren Blute habe ich bei der Rezidivschizogonie keine Schizonten gefunden. Sie liegen vielmehr in Endothelien und Makrophagen (Fig. 69) der Milz, in dem Endothel der Lebercapillaren (in den „Zinnoberzellen“ = KUPFFER'schen Sternzellen), also in den Zellen, die normalerweise oft mit „Würmchen“ geradezu vollgepfropft sind. Daß es sich dabei nicht um Phagocytose, sondern um Parasitismus handelt, zeigt die unversehrte Beschaffenheit der Parasiten, um die sich meist ein deutlicher wie durch eine Hülle bedingter hellerer

Bezirk wahrnehmen läßt. Daß die Wärme und die durch sie hervorgerufene Steigerung der Lebensfunktionen allein das Eintreten der Rezidive bedingen, beobachtete ich an einem Anfang Mai 1912 mit sehr spärlicher Infektion eingefangenen Wasserfrosche, der in einem Glase isoliert gehalten wurde und nur selten einige Fliegen erhielt. Bei der am 8. VII. 12 vorgenommenen Sektion waren Leber und Milz geradezu von Schizonten vollgepfropft. Im peripheren Blute waren keine Schizonten erschienen. Die histologische Untersuchung von Milz und Leber ergibt meist auffallend große, häufige Herde von Melanin- und Hämosiderinablagerungen, an deren Peripherie die meisten Schizonten liegen. In der Leber sind die Schizonten stets auf das Blutgefäßsystem beschränkt; in den Leberdrüsenzellen und im Epithel der Gallengänge und des Darmes habe ich nie einen Schizonten gesehen. Mit den Schizonten oder doch jungen Merozoiten scheint eine Infektion von Tier zu Tier möglich zu sein. Es ist wohl kein Zufall, daß mir der einzige geglückte Infektionsversuch gerade ein Jahr vorher am 9. VII. 11 gelang, so daß jedenfalls der Ausgangsfrosch sich gerade in einer Rezidivperiode befand. Auffällig ist, daß sich bei den Rezidiven die Schizonten fast alle ziemlich gleich entwickeln. Sind massenhaft erwachsene und reife Schizonten vorhanden, so fehlen die jüngsten Ausgangsformen meist schon ganz. Jedenfalls ist das Eintreten wie beim Malariaparasiten und beim Tauben-*Haemoproteus* durch Parthenogenese bedingt (SCHAUDINN, HARTMANN). Versuche, die Rezidive im Winter durch warme Aufbewahrung und starke Fütterung der Frösche hervorzurufen, sind bis jetzt erfolglos geblieben.

Versuche zur Ermittlung des Überträgers.

Da ich selbst bei Fröschen, die in den inneren Organen massenhaft Schizonten zeigten, im Darmepithel und im Darmlumen niemals *Lankesterella*-Stadien fand, blieb zur Erklärung der Verbreitung von Frosch zu Frosch nur die Annahme eines Überträgers übrig. In der Karpfenlaus werden nach LABBÉ die Lankesterellen verdaut. Den Pferdeegel (*Haemopsis sanguisuga* L. = *Aulastomum gulo* Moq. TAND.) konnte ich nie zum Blutsaugen an Wasserfröschen bewegen. Im Blutegel (*Hirudo medicinalis* L.) hielt sich *Lankesterella* mehrere Tage am Leben, starb aber dann ab.

Zur Prüfung, ob *Hemiclepsis marginata* O. F. MÜLLER als Überträger wirkt, wurden über 70 Versuche mit jungen nüchternen Egeln angestellt. Weitere zur Kontrolle zerpupfte junge Egel und die in

Serienschnitten untersuchten, die Blut eines *Lankesterella*-freien Wasserfrosches gesogen hatten, zeigten nirgends im Darmkanale *Lankesterella*-ähnliche Parasiten. Die über 70 Egel, die im Laufe des August, September und Oktober an einigen mäßig stark mit *Lankesterella* infizierten Wasserfröschen Blut gesogen hatten, wurden teilweise zerzupft, zum Teil in Sublimatlösung in Abständen fixiert und in mit Hämalaun gefärbten Serienschnitten untersucht. Die Egel wurden bis zur Untersuchung bzw. Fixierung in einem $+10$ bis $+25^{\circ}$ C warmen Raume aufbewahrt. An den unter dem Mikroskop lebend untersuchten Egel lassen sich die *Lankesterella*-Exemplare meist nicht erkennen. In den zerzupften Egel fand ich in den ersten Tagen reichlich bewegliche, freie, unveränderte *Lankesterella*-Exemplare. Nach 5–8 Tagen fanden sich die Würmchen nicht mehr im Mageninhalt, sondern sie erschienen erst in reichlicher Zahl, wenn der Egel gründlich zerzupft wurde. Dieser Umstand ließ darauf schließen, daß sie in das Gewebe des Egel eingedrungen waren. Dasselbe zeigten auch alle später zerzupften Egel. Von ungefähr 40 vom 2. Tage bis zum Ablaufe von 6 Wochen nach dem Saugakte zerzupften Exemplaren fanden sich die „Würmchen“ in einem jeden vor, auch in denen, die inzwischen Blut von nicht infizierten Kaulquappen gesogen hatten. Ein Übergang in das Gefäßsystem fand nicht statt. Morphologische Veränderungen oder Vermehrungsvorgänge wurden nicht gesehen.

Bei den in gefärbten Serienschnitten untersuchten Egel fanden sich die *Lankesterella*-Exemplare in den ersten 8 Tagen noch mehr oder minder reichlich in dem Magenumen. Doch schon vom 4. Tage an fanden sich zahlreiche Exemplare im Epithel der Magenwand. Die Formen zeigten morphologisch, auch im Kernbau, volle Übereinstimmung mit denen aus dem Froschblute, nur bei manchen Exemplaren zeigte der Kern das Chromatin in sehr lockerer Anordnung (weibliche Gameten?). Manche erschienen etwas kürzer. Um jedes Exemplar ließ sich ein schmaler, hellerer Bezirk im Epithel wahrnehmen. In der Mitte und hinteren Hälfte des Magens saßen die meisten Exemplare. Im Darm, in dem die Entwicklung der Schildkrötenhämogregarinen nach REICHENOW und ROBERTSON stattfindet, ließen sich weder im Lumen noch im Epithel jemals Exemplare auffinden. Während der späteren Zeit (die letzten untersuchten Egel hatten 41 Tage vorher am *Lankesterella*-Frosche und 26 Tage vorher an einer nicht infizierten Kaulquappe Blut gesogen) fanden sich in den Serienschnitten die *Lankesterella*-Würmchen stets nur im Magenepithel. Zwei eng beisammenliegende Exemplare

wurden oft gefunden, doch keine Protoplasma- oder Kernverschmelzung (Fig. 71). Eine Durchwanderung in die Leibeshöhle fand nicht statt. In der Rüsselscheide wurden niemals Parasiten gefunden.

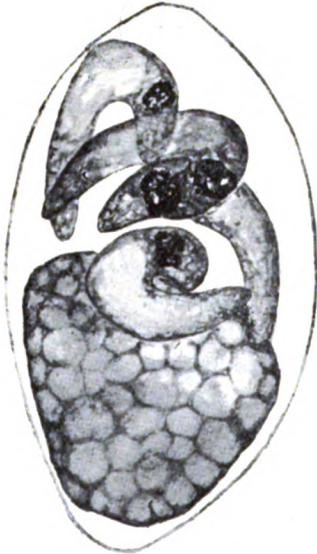
Kaulquappen, an denen infizierte Egel sogen, blieben *Lankesterella*-frei. Ein erwachsener Wasserfrosch, dem ich einen zerzupften, infizierten Egel in den Rückenlymphsack einbrachte, blieb uninfiziert. Fütterungsversuche habe ich noch nicht anstellen können, da zahlreiche im August 1912 eingefangene größere und kleinere *Hemiclepsis*-Exemplare sich bis jetzt (März 1913) noch nicht zum Anbeißen haben bewegen lassen.

Deutung der Befunde. Systematische Stellung der *Lankesterella*.

Die Deutung der bei der Neuinfektion auftretenden Schizogonie mit weniger (bis 32) und größeren Merozoiten als Agamogonie und der Rezidivschizogonie mit den kleineren Merozoiten als Gametenbildung ist nach den Befunden von REICHENOW, ROBERTSON und WENYON an anderen Hämogregarinen wahrscheinlich richtig. Die in den Erythrocyten vorkommenden Würmchen sind wohl als Gameten aufzufassen. LABBÉ (1894) gibt an, er habe in den Sommermonaten eine isogame Befruchtung mehrfach im Leben beobachtet und bildet auch Stadien dieses Vorganges ab. Ich habe diese Beobachtung nicht bestätigen können. Daß *Hemiclepsis* den Überträger darstellt und nicht nur die „Würmchen“ am Leben erhält, geht aus der langen Dauer des Vorkommens der Parasiten und ihrem Eindringen in das Magenepithel zweifellos hervor. Daß mir dort metagame Vermehrungsvorgänge entgangen wären, ist nicht wahrscheinlich. Ausschließen läßt sich die Möglichkeit, daß die Würmchen bei erwachsenen Egel auf die Jungen übergehen und dort wie bei *Karyolysus* (SCHAUDINN, REICHENOW) und wahrscheinlich *Hepatozoon* (REICHENOW) eine Vermehrung (Sporogonie) durchmachen, nicht ganz, doch spricht das monatelange Verweilen im Magenepithel gegen eine solche Deutung, da bei jenen Gattungen der Übertritt in das Cölom bald erfolgt. Es ist nach alledem nicht ausgeschlossen, daß bei *Lankesterella* die Sporogonie und damit Vermehrung im Überträger wegfällt und daß die in dem Magenepithel sich später befindenden Würmchen schon Ookineten darstellen, die aus einer Anisogamie hervorgegangen sind, deren Einleitung Fig. 71 zeigt. Dann würden ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei *Haemoproteus columbae* nach SERGENT und ARAGAO, da sich dieser Parasit im

Überträger auch nur bis zum Ookineten entwickelt und keinerlei metagame Vermehrungsvorgänge durchmacht. Die Neuinfektion erfolgt dann höchstwahrscheinlich durch Verschlucken der Egel.

Daß *Lankesterella* infolge der Art ihrer Schizogonie zu den Hämogregarinen in dem von REICHENOW 1912 vorgeschlagenen Umfange zu stellen ist, steht fest. Auch die eigene Gattung für den Froschblutparasiten ist wegen der Eigenheiten (Besitz der Vakuolen,



Textfig. D. *Isospora*-Spore kurz nach Zusatz von Darmsaft fixiert. Hämalaun. 2700 \times .

reduzierte Entwicklung im Überträger) beizubehalten. Zur Gattung *Lankesterella* LABBÉ 1899 gehört als einzige sichere Art *Lankesterella minima* CHAUSSAT 1850. Der einzige sichere Wirbeltier-Wirt dieses Parasiten ist der Wasserfrosch (*Rana esculenta* L.). Die Angaben über das Vorkommen in anderen tropischen Fröschen und Kröten sind alle so unsicher, daß es sich nicht entscheiden läßt, ob den Autoren wirklich diese Art oder eine andere Hämogregarine vorgelegen hat. Eine Infektion der Wasserfroschkaulquappen ist bis jetzt noch nicht gefunden worden.

Ob der von CLELAND und JOHNSTON 1911 beschriebene ähnliche Parasit aus australischen Laubfröschen wirklich in der

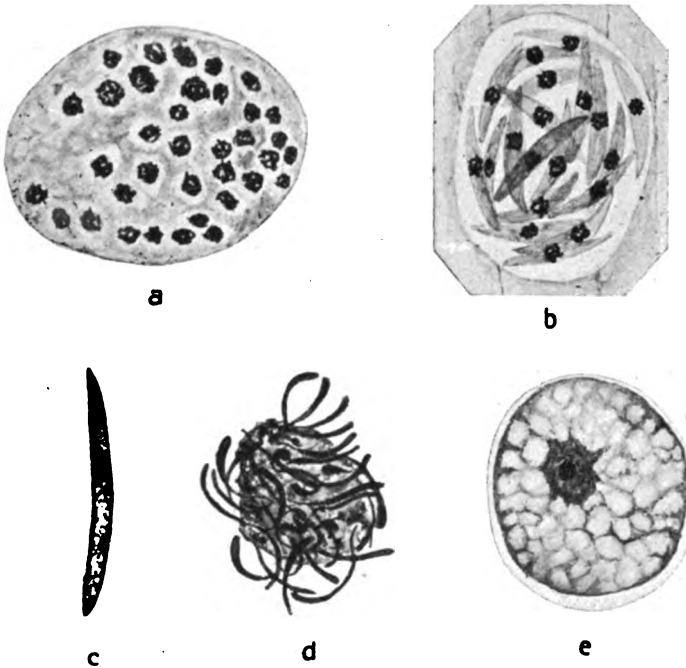
Gattung *Lankesterella* unterzubringen ist, läßt sich aus den schematischen Figuren jener Autoren nicht entscheiden.

Fehlerquellen bei der *Lankesterella*-Untersuchung.

Von Sporozoen des Wasserfrosches, von denen Entwicklungsstadien mit *Lankesterella* verwechselt worden sind, kommen *Isospora lieberkühni* LABBÉ und *Eimeria prevoti* LAVERAN und MESNIL in Betracht.

Isospora lieberkühni trat 1912 in der Umgebung Berlins so häufig bei Wasserfröschen auf, daß es mir nicht gelang, sicher uninfizierte Frösche zu Infektionsversuchen zu bekommen. Ich beschränke mich deshalb auf die Wiedergabe einer Abbildung über

das Verhalten der Sporen beim Zusatz von abgeschabtem und zerquetschtem Darmepithel oder Pankreas gut genährter und verdauender Wasserfrösche (Textfigur D). Das Schauspiel, das die Sporozoiten beim Zusatz des Darmsaftes bieten, ist schon von LAVERAN und MESNIL beschrieben worden. Es ist so anziehend und so einfach herbeizuführen, daß sich *Isospora*-Sporen viel besser zur Demonstration des Ausschlüpfens der Sporozoiten empfehlen als die gewöhnlich benutzten von *Eimeria stiedae*. Bei den mit reifen Sporen gefütterten



Textfig. E. *Eimeria Prevoti*.

a, b Schizonten; c großer Merozoit (Ausstrich); d reifer Microgametocyt (Schnitt); e Macrogametocyt. Schnitt. Hämalau. 2700 X.

Wasserfröschen finden sich nach 24 Stunden die ausgeschlüpften Sporozoiten meist in Leucocyten eingeschlossen im Epithel des Froschdarmes.

Von *Eimeria prevoti*, die bei HINTZE eine verhängnisvolle Rolle gespielt hat, seien einige Abbildungen von Schizonten, Merozoiten und Gametocyten gegeben. Die Bestimmung der Art geschah nach den im Kote des betreffenden jungen Wasserfrosches in Menge vorhandenen reifen Sporocysten.

Zum Schlusse erfülle ich die Dankspflicht gegen die Herren, die meine Arbeit gefördert und ermöglicht haben. Herr Professor Dr. KITT danke ich für den Arbeitsplatz, für die vielseitige Unterstützung, die er mir angedeihen ließ, und für das warme Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte. Herrn Geheimrat Professor Dr. SCHMALTZ, in dessen Laboratorium ich die Befunde über die *Lankesterella*-Schizogonie, *Isospora* und *Eimeria* erheben konnte, bin ich zum Danke verpflichtet. Herrn Prof. Dr. HARTMANN sage ich meinen Dank für die Vermittlung wertvoller Literatur, die in München nicht erreichbar war.

Nachtrag.

Vier Wochen nach Erscheinen meiner vorläufigen Mitteilung berichtete DOFLEIN in einer Sitzung der Naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg (am 19. Februar 1913) über Dauerformen und Immunität beim Froschtrypanosoma. Der Bericht DOFLEIN's bringt bemerkenswerte Untersuchungen über das Vorkommen von Fett bei der dicken gestreiften Form und bei den Kulturformen. Sodann hat DOFLEIN's Schülerin MENDELEEFF-GOLDBERG versucht, die Froschtrypanosomen vom Standpunkte der Immunität zu prüfen. Kulturformen (von welcher Form des Froschtrypanosomas sie abstammen, ist nicht gesagt, doch scheint DOFLEIN die schlanke geißeltragende Form für teilungsfähiger zu halten als die dicke gestreifte Form) sollen vom Blute infizierter Frösche in wenigen Minuten vollkommen aufgelöst werden, während sie im Kaulquappenblute lebend bleiben und bei Einspritzung eine Infektion hervorrufen. Aus diesem Verhalten schließt DOFLEIN, daß schon die Kaulquappen infiziert werden und die alten Frösche immun seien. Daß der Ausdruck Immunität nicht berechtigt ist, habe ich bereits auseinandergesetzt. Es handelt sich vielmehr um eine labile Infektion im Sinne SCHILLING's. Infektionen erwachsener Frösche mit Kulturformen sind DOFLEIN nicht geglückt; LEBEDEFF und mir sind sie mehrfach gelungen. Wenn DOFLEIN meine am 22. Januar 1913 erschienene vorläufige Mitteilung als „Bestätigung“ seiner Vermutung, daß schon die Kaulquappen natürlicherweise infiziert werden, ansieht, so muß ich darauf hinweisen, daß ich das, was er vermutete, bereits bewiesen hatte.

Außerdem haben mir neuere exakte Versuche gezeigt, daß eine natürliche Infektion durch Egelbiß ein ganz anderes Bild bietet

als eine Infektion durch Einspritzung von Kulturformen bei Kaulquappen. Während nach dem Egelbisse die Kaulquappen monatelang nur die Trypanosomenform in ihrem Blute zeigen, die ich als Kaulquappentrypanosoma beschrieben habe, zeigten von sieben mit Kulturtrypanosomen 8. Generation (Stamm von der dicken gestreiften Varietät, gewonnen am 19. Dezember 1912) Ende Mai 1913 intraperitoneal gespritzten Grasfroschkaulquappen sechs Trypanosomen, die aber von dem Kaulquappentrypanosoma grundverschieden waren. Am 7. Tage nach der Injektion fanden sich im Blute Tiere, die der von DUTTON und TODD als *Tryp. mega* beschriebenen Form in der Größe und in allen Einzelheiten glichen (der Kern ist ein Caryosomkern mit rundem, kompaktem Caryosome!). Diese Formen pflegten um den 8. Tag spärlicher zu werden und der dicken, gestreiften Form zu weichen, die in der nächsten Zeit allein anzutreffen war. Versuche, die dahin zielen, die Ursachen dieses verschiedenen Infektionsverlaufes aufzudecken, sind bereits im Gange.

Bei einer Nachprüfung der Ergebnisse von MENDELEEFF-GOLDBERG habe ich diese nicht bestätigen können. Bei einem infizierten Frosche konnte ich keine restlose Auflösung der Kulturformen beobachten, obgleich ich einen Wasserfrosch ausgewählt hatte, der die dicke gestreifte Form im Blute zeigte, also dieselbe Form, von der mein Kulturstamm abstammt und die er bei Einspritzung in Frösche und Kaulquappen zum Erscheinen bringt. In den ersten Minuten wurden eine Anzahl Kulturformen (vor allem kleine Formen mit vakuoligem oder körnigem Protoplasma (Fettkörner? Degenerationsformen?) aufgelöst. Andere Formen mit vorwiegend homogenem Protoplasma konnten noch über 30 Minuten in lebhafter Bewegung beobachtet werden. Genau dasselbe Ergebnis hatte ich bei Zusatz des Blutes einer jungen nicht infizierten Wasserfroschkaulquappe

Literaturverzeichnis.

Die mit * bezeichneten Arbeiten waren mir nur im Referate zugänglich.

- ARAGAO, H. DE B. (1908): Über den Entwicklungsgang und die Übertragung von *Haemoproteus columbae*. Arch. f. Protistenk. Bd. 12.
- (1911): Beobachtungen über Hämogregarinen von Vögeln. Mem. do Instituto Oswaldo Cruz Bd. 3 Heft 1 p. 54—64.
- BERESTNEFF, N. (1903): Über einen neuen Blutparasiten der indischen Frösche. Arch. f. Protistenk. Bd. 2 p. 342—348.
- BILLET, A. (1904): Sur le *Trypanosoma inopinatum* de la grenouille verte et sa relation possible avec les *Drepanidium*. Compt. rend. de la Soc. de Biol. Bd. 57 p. 161—165.
- (1904): Culture d'un *Trypanosome* de la grenouille chez une Hirudinée; relation ontogénétique possible de ce trypanosome avec une Hémogregarine. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences Bd. 139 p. 574—576.
- BOUET, G. (1906): Culture du trypanosome de la grenouille. Ann. de l'Inst. Pasteur Bd. 20 p. 564—577.
- BRUMPT, E. (1904): Contribution à l'étude de l'évolution des Hémogregarines et des Trypanosomes. Compt. rend. de la Soc. de Biol. Bd. 57 p. 165—167.
- (1906 a): Mode de transmission et évolution des trypanosomes et des trypanoplasmes des poissons . . . Compt. rend. de la Soc. de Biol. Bd. 60 p. 162—165.
- (1906 b): Expériences relatives au mode de transmission des trypanosomes et des trypanoplasmes par les Hirudinées. Dasselbst Bd. 61 p. 77—79.
- (1906 c): Rôle pathogène et mode de transmission du *Trypanosoma inopinatum* Ed. et Ét. Sergent. Mode d'inoculation d'autres trypanosomes. Dasselbst Bd. 61 p. 167—169.
- (1907): De l'hérédité des infections à Trypanosomes et à Trypanoplasmes chez les hôtes intermédiaires. Dasselbst Bd. 63 p. 176—178.
- CHAUSSAT, J. B. (1850): Des Hématozoaires. Thèse pour le doctorat en médecine. Paris. (Universitätsbibliothek Straßburg.)
- CELLI, A. und SANFELICE, F. (1891): Über die Parasiten des roten Blutkörperchens im Menschen und in Tieren. Fortschr. d. Med. Bd. 9 p. 504—507. Taf. 5.
- CLELAND, J. B. and JOHNSTON, T. H. (1911): The Haematozoa of Australian Batrachians. Journ. and Proc. of the Roy. Soc. of New South-Wales Bd. 44 p. 252—261.
- DANILEWSKY, B. (1886): Zur Parasitologie des Blutes. Biolog. Centralbl. Bd. 5 p. 529—537.
- (1886): Les cultures capillaires. Arch. slaves de Biol. Paris Bd. 1 p. 48—51.
- (1886): Matériaux pour servir à la parasitologie du sang I. und II. Archives slaves de Biol.
- * — (1889): Parasitologie comparée du sang. Charkoff 1888—1889.
- DOFLEIN, F. (1910): Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Frosches. Arch. f. Protistenk. Bd. 19.
- * DURHAM, H. E. (1902): *Drepanidium* in the toad. Liverpool School of Tropical Medicine. Memoir VII p. 78—79.

- * DUTTON, J. E., TODD, J. L. and TOBRY, E. N. (1907): Concerning certain parasitic Protozoa observed in Africa. *Ann. of Trop. Med. and Parasitol.* Bd. 1 p. 287—370.
- FANTHAM, H. B. (1905): *Lankesterella tritonis* n. sp., a Haemogregarine from the blood of the Newt, *Triton cristatus*. *Zool. Anz.* Bd. 29 S. 257—263.
- FINKELSTEIN, N. J. (1908): Parasites endoglobulaires du sang chez les animaux à sang froid du Caucase. *Arch. des Sciences Biol. de St. Pétersburg* Bd. 13 p. 137—168.
- FRANÇA, C. et ATHIAS, M. (1906): Recherches sur les Trypanosomes des Amphibiens. I. Les Trypanosomes de *Rana exulenta*. *Arch. do R. Instituto Bact. Camara Pestana* Bd. 1 p. 127—166.
- — (1907): II. Les Trypanosomes de *Hyla arborea*. *Dasselbst* Bd. 1 p. 289—310.
- FRANÇA, C. (1908a): Notes sur la biologie des Trypanosomes. *Dasselbst* Bd. 2 p. 43—50.
- (1908b): Le cycle evolutif des Trypanosomes de la grenouille (*T. costatum*, *T. rotatorium*, *T. inopinatum*). *Dasselbst* Bd. 2 p. 89—93.
- (1908c): Le Trypanosoma de l'Anguille (*T. granulosum* Laveran et Mesnil). *Dasselbst* Bd. 2 p. 113—122.
- (1908d): Quelques notes sur l'Haemogregarina splendens Labbé. *Dasselbst* Bd. 2 p. 123—131.
- (1909a): Encore sur le Trypanosome de *Hyla arborea*. *Dasselbst* Bd. 2 p. 271 bis 272.
- (1909b): Le cycle evolutif des Trypanosomes de la grenouille. Remarques à propos du travail de M. M. W. S. Patton et C. Strickland. *Dasselbst* Bd. 2 p. 381—384.
- (1911): Sur le relation autogénétique entre les grands et les petits Trypanosomes de la grenouille. *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* Bd. 71 p. 978 bis 979.
- * — (1911): Note sur la transformation in vitro des formes crithidiennes en formes trypanosomiques. *Bull. de la Soc. de Path. exotique* Bd. 4 p. 534.
- * — (1912): Les formes aflagellées dans l'évolution d'un Trypanosome da Batracien (*T. undulans*). *Dasselbst* Bd. 5 Februar 1912.
- GABRITCHEWSKY (1890): Contribution à l'étude de la parasitologie du sang. *Ann. de l'Inst. Pasteur* Bd. 4 p. 440—445.
- GRASSI e FELETTI (1892): Contribuzione allo studio dei parassiti malarici, *Atti dell'Accad. Gioenia di science naturali in Catania* Ser. 4 Bd. 5 Mem. 5.
- HARTMANN, M. (1911): Über die willkürliche Hervorrufung von Rezidiven bei Protozoenkrankheiten durch künstliche Parthenogenese. *Folia serologica* Bd. 7 p. 585—592.
- HINTZE, R. (1901, 1902): Lebensweise und Entwicklung von *Lankesterella minima* Chaussat. *Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ontog.* Bd. 15 p. 693—730.
- KEYSERLITZ (1906): Generations- und Wirtswechsel von *Trypanoplasma borelli* Laveran und Mesnil. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 7 p. 1—74.
- KONINSKI, H. (1901): Beitrag zur Kenntnis des *Trypanosoma sanguinis* bei den Batrachieren. *Biol. Centralbl.* Bd. 21 p. 40—43.
- KRUSE, W. (1890): Über Blutparasiten. *Virch. Arch.* Bd. 120 p. 541—560.
- (1896): Die Protozoen in FLÜGGE, die Mikroorganismen. 3. Auflage, Leipzig p. 653—658.

- LABBÉ, A. (1894): Recherches zoologiques et biologiques sur les parasites endoglobulaires du sang des vertébrés. Arch. de Zool. expér. et gén. Ser. 3 Bd. 2 p. 55—252.
- (1899): Sporozoa. In: das Tierreich. 5. Liefer. Berlin 1899.
- LAVERAN, A. et MESNIL, F. (1902): Sur la coccidie trouvée dans le rein de la *Rana esculenta* et sur l'infection générale qu'elle produit. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences Bd. 135 p. 82.
- — (1904): Trypanosomes et Trypanosomiasés. Paris. Masson éd.
- LEBEDEFF, W. (1910): Über *Trypanosoma rotatorium* (Gruby). Festschrift zum 60. Geburtstag RICHARD HERTWIG's. Jena, Bd. 1 p. 397—436.
- * LEWIS, J. and WILLIAMS, H. V. (1905): The results of attempt to cultivate the trypanosomes from frogs. Amer. Med. Bd. 9 p. 591.
- MACHADO, A. (1911): Zytologische Untersuchungen über *Trypanosoma rotatorium* Gruby. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz Bd. 3 p. 108—134.
- MATHIS, C. (1906): Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal pour la culture des Trypanosomes. Compt. rend. de la Soc. de Biol. Bd. 61 p. 550—552.
- MATHIS, C. et LÉGER, M. (1911 a): Trypanosomes du crapaud du Tonkin. Dasselbst Bd. 71 p. 956, 1008.
- — (1911 b): Recherches de Parasitologie et de Pathologie humaines et animales au Tonkin. Paris, Masson éd.
- NERESHEIMER, E. (1909): Über das Eindringen von *Lankesterella spec.* in die Froschblutkörperchen. Arch. f. Protistenk. Bd. 16 p. 187—193.
- NÖLLER, W. (1912 a): Über eine neue Schizogonie von *Lankesterella minima* Chaussat. Arch. f. Protistenk. Bd. 24 p. 201—208.
- (1912 b): Die Übertragungsweise der Rattentrypanosomen durch Flöhe. Dasselbst Bd. 25 p. 386—424.
- (1913): Die Blutprotisten des Wasserfrosches und ihre Übertragung (Vorläufige Mitteilung). Dasselbst Bd. 28 p. 313—316. 22. Januar 1913.
- PATTON, W. S. (1909): The life-cycle of a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tracts of *Tabanus hilarius* and *Tabanus sp.*? Arch. f. Protistenk. Bd. 15 p. 333—362.
- REICHENOW, E. (1910): *Haemogregarina stepanowi*. Die Entwicklung einer Hämogregarine. Arch. f. Protistenk. Bd. 20.
- (1912): Die Hämogregarinen. In PROWAZEK, Handb. der pathogenen Protozoen 5. Liefg. Leipzig.
- ROBERTSON, M. (1909): Further notes on a Trypanosome found in *Pontobdella muricata*. Quart. Journ. of Microscopical Science Bd. 54 p. 119.
- (1910): Studies on Ceylon Haematozoa. II. Notes on the life-cycle of *Haemogregarina nicoriae* Cast. and Willey. Dasselbst Bd. 55.
- (1911): Transmission of flagellates living in the blood of certain freshwater fishes. Philosophical Transactions of the Roy. Soc. of London Ser. B Bd. 202 p. 29—50.
- ROSENBUSCH, F. (1909): Trypanosomenstudien. Arch. f. Protistenk. Bd. 15 p. 263.
- RUGE, R. (1903): Die Malaria Parasiten. In KOLLE-WASSERMANN, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1. Aufl. Bd. 1 p. 834—840.
- * SCHALACHNIKOFF (1888): Recherches sur les parasites du sang des animaux à sang chaud et à sang froid. Charkoff.

- SCHAUDINN, F. (1900): Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. Bd. 13.
- SERGENT, EDM. et ET. (1904): Sur un Trypanosome nouveau, parasite de la grenouille verte. Compt. rend. de la Soc. de Biol. Bd. 56 p. 123—124.
- — (1905): Hématozoaires de Rana esculenta en Algérie. Dasselbst Bd. 58 p. 670—672.
- ZIEMANN, H. (1898): Über Malaria und andere Blutparasiten. Jena.

Tafelerklärung.

Sämtliche Figuren sind nach feucht fixierten und stets feucht weiterbehandelten Präparaten mit Apochromat 2 mm oder mit Achromatimmersion $\frac{1}{12}$ und den Kompensationsokularen 4, 8 oder 12 in der Höhe der Tischplatte gezeichnet worden. Die mit Objektmikrometer bestimmte Vergrößerung beträgt bei Fig. 8—10ca. 1000×, bei Fig. 1, 2 und 12 ca. 2000×, bei Fig. 22—52 und 55—72 ungefähr 2700×, bei Fig. 3—7 und 11—21 und 53—54 ca. 2900×. Die Färbung war bei Fig. 1—9 und 15—20 Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN; bei Fig. 29, 34—36, 46, 47 und 58—63 Hämatoxylin nach DELA FIELD; bei Fig. 54 Boraxmethylenblau feucht; bei Fig. 10—14, 21—28, 30—33, 37—45, 48—53, 55—57 und 64—72 Hämalau.

Tafel 13.

- Fig. 1—21. *Trypanosoma rotatorium*.
- Fig. 1 u. 2. Trypanosomen aus dem Kaulquappenblute.
- Fig. 3—7. Entwicklungsformen aus dem Magen experimentell infizierter junger Exemplare von *Hemiclepsis marginata*.
- Fig. 8 u. 9. Geißeltragende glatte Formen mit gestrecktem (polar gebautem) Kerne aus dem Blute des Laubfrosches.
- Fig. 10. Dicke gestreifte Form. Wasserfrosch.
- Fig. 10—21. Formen aus Deckglaskulturen der dicken gestreiften Form.
- Fig. 11. Kern und Blepharoplast einer abgekugelten Form.
- Fig. 12. Trypanosomen bei der Abkuglung.
- Fig. 13—14. Die erste Teilung.
- Fig. 15—21. Spätere Teilungen im geißellosen Zustande 20—24 Stunden nach Anfertigung der Deckglaskulturen.
- Fig. 20. Drei Mitosen innerhalb eines Protoplasmakörpers. Sehr selten.
- Fig. 22—54. *Dactylosoma ranarum*. Die Erythrocyten sind aus Raumersparnis nicht mitgezeichnet.
- Fig. 22—24. Junge Merozoiten.

Tafel 14.

- Fig. 25—31. Heranwachsende Schizonten.
- Fig. 33—38. Gewöhnliche reife Schizonten.
- Fig. 38. Der Kern des befallenen Erythrocyten ist mitgezeichnet.
- Fig. 39—40. Seltenerer Art der Schizogonie. Knospung. Gametenbildung?
- Fig. 41—45. Männliche (?) Gameten.

Fig. 45. Die in den übrigen Figuren weggelassenen Konturen des befallenen Erythrocyten sind hier angegeben. 2700 X.

Fig. 46—47. Junge weibliche (?) Gameten.

Fig. 48—52. Reife intrazelluläre weibliche Gameten.

Fig. 53—54. Aus dem Erythrocyten ausgeschlüpfte weibliche Gameten.

Fig. 53. In Ruhe. Keulenform.

Fig. 54. Kriechend. Vorderende zugespitzt.

Fig. 55—72. *Lankesterella minima*.

Fig. 55—57. Bewegliche Würmchen (Gameten) aus Blut und Milz. Männliche und weibliche Gameten nicht unterscheidbar.

Fig. 57. Häufig vorkommende geknickte Form. Intrazellulär im Erythrocyten.

Fig. 58. Junger Merozoit. Milz.

Fig. 59—60. Junge Formen mit Hülle. Junge Schizonten? Milz.

Fig. 61. Zwei Tiere in einer Hülle.

Fig. 62—63. Kleine, junge Schizonten. Milz.

Fig. 64—68. Schizonten der Sommerrezidivschizogonie (Gamogonie?). Leber. Schnitt.

Fig. 67. Restkörper vorhanden.

Tafel 15.

Fig. 69. *Lankesterella* in einem Makrophagen (Endothelzelle?). Milz.

Fig. 70—72. *Lankesterella* im Magenepithel von *Hemiclepsis marginata*. Schnitt.

Fig. 70. Ins Epithel eingedrungener Gamet 13 Tage nach der Blutaufnahme.

Fig. 71. Beginnende Kopulation? 13 Tage nach der Blutaufnahme.

Fig. 72. Ookinet (?) tief im Magenepithel. 41 Tage nach der Blutaufnahme.

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

Die Immunitätsfrage bei der Trypanosomenkrankheit der Frösche.

Von
Polina Mendeleeff-Goldberg.

(Hierzu Tafel 16 u. 17 und 9 Textfiguren.)

Inhaltsverzeichnis.

- I. Historisches.
 - II. Morphologische Beschreibung der vegetativen Froschtrypanosomen.
 - III. Technik.
 - IV. Kulturen.
 - 1. Morphologische Veränderungen unter dem Einflusse des verschiedenen Mediums.
 - 2. Cytologische Untersuchungen, Kern, Caryosom und Protoplasma bei den jungen und alten Kulturen.
 - V. Ernährung der Parasiten.
 - VI. Tierversuche.
 - VII. Einfluß der Temperatur auf die Kulturtrypanosomen und deren Empfindlichkeit gegen die verschiedenen osmotischen Unterschiede.
 - VIII. Die Immunitätsfrage.
 - 1. Versuche mit inaktiviertem und reaktiviertem Froschblute.
 - 2. Impfversuche an Kaulquappen mit Kulturtrypanosomen.
 - 3. Immunisierung der Frösche und die Anpassungsfähigkeit der Trypanosomen an das Froschblut.
 - 4. Abschwächung der Immunität durch höhere Temperatur oder durch die Erkrankung der Frösche.
 - 5. Entwicklungscyclus der Trypanosomen in bezug zu der Immunitätsfrage.
 - IX. Ergebnisse.
- Literaturverzeichnis.
Tafelerklärung.
-

Historisches.

Die vorliegenden Untersuchungen an *Trypanosoma rotatorium* GRUBY wurden im zoologischen Institut München auf Anregung von Herrn Prof. DOFLEIN angestellt. Ich möchte ihm an dieser Stelle für alle hierbei erteilten Ratschläge und Winke meinen aufrichtigsten Dank aussprechen. Des weiteren ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. HERTWIG für das meiner Arbeit entgegengebrachte große Interesse meine Dankbarkeit zum Ausdruck zu bringen. Schließlich möchte ich Herrn Dr. JOLLOS für so manche wichtige Mitteilungen und Herrn Dr. KÄMMERER für die liebenswürdige Bereitwilligkeit, mit der er mir die notwendigen Apparate des Klin.-med. Institutes zur Verfügung stellte, meinen besten Dank sagen.

Im Blut von *Rana temporaria* und besonders von *Rana esculenta* findet man Trypanosomen, die von vielen Autoren schon ausführlich beschrieben und untersucht worden sind. Die Schilderungen sind bei allen Autoren so verschieden, daß man bis jetzt noch zu keinen übereinstimmenden Resultaten über die Tiere gekommen ist. Die Abweichungen in der Beschreibung sind sowohl in morphologischer als auch in entwicklungsgeschichtlicher Beziehung auffallend verschieden und sogar die Benennung und die systematische Einreihung des Tieres hat viele Wandlungen durchgemacht. Die Parasiten sind schon im Jahre 1842 von GLUGE gesehen worden. Im Jahre 1843 wurden sie von MAYER als *Paramaccium loricatedum* und *Amoeba rotatoria* bezeichnet. Im Jahre 1844 hat GRUBY dem Tiere den Namen *Trypanosoma rotatorium* gegeben und trotz dieser passenden Bezeichnung haben noch andere Autoren versucht, dem Tiere andere Namen beizulegen. WEDEL wollte es *Globularia radiata* benennen, LIEBERKÜHN schlägt vor, es in *Monas rotatoria* umzutaufen und im Jahre 1880 will GAULE die Tiere überhaupt aus dem Tierreiche ausschalten, da er glaubte, daß sie aus den Leucocyten des Froschlutes entstanden sind.

Erst von den neuen Forschern ist der alte Name wieder aufgenommen worden und die Tiere werden jetzt von allen Autoren übereinstimmend als *Trypanosoma rotatorium* GRUBY bezeichnet. Da man aber in einem infizierten Frosch Trypanosomen von verschiedener Gestalt antrifft, so sind für die Erklärung dieser Tatsache die verschiedensten Theorien aufgestellt und die verschiedensten Deutungen gegeben worden. ATHIAS und FRANÇA haben die verschieden aussehenden Trypanosomen als verschiedene Arten be-

schrieben, indem sie die Tiere in *Trypanosoma postatum*, *Trypanosoma loricatum*, *Trypanosoma rotatorium*, *Trypanosoma elegans* usw. eingeteilt haben. Im Jahre 1907 hat DOFLEIN die Ansicht ausgesprochen, daß die verschieden aussehenden Tiere zu einer Art gehören müssen, die ihre Form nur durch die Anpassungsfähigkeit gewechselt haben. Im Jahre 1910 hat LEBEDEFF die verschiedenen Formen wieder in chromidiale, sterile, indifferente und gewöhnliche Typen eingeteilt. Endlich im Jahre 1911 werden die verschiedenen Trypanosomenformen von A. MACHADO als geschlechtlich verschiedene Typen differenziert. Wenn ich auch die Untersuchungen von anderen Autoren an dieser Stelle nicht erwähne, so zeigt doch schon diese kleine Übersicht, wie verschieden die Ansichten über die Trypanosomen sind.

Morphologische Beschreibung.

Meine Untersuchungen und die vorliegenden Experimente stehen DOFLEIN's Auffassung über die Anpassungsfähigkeit der Tiere näher und geben auch weitere Beweise dafür, daß alle die verschiedenen Formen zu den Trypanosomen einer Art angehören müssen. Ich möchte die verschieden aussehenden Trypanosomen in zwei Gruppen einteilen: Zu der ersten gehören die Trypanosomen, die in den großen Blutbahnen der Frösche leben; die zweite Gruppe bilden diejenigen Formen, die nur in einigen Organen vorkommen. Ich möchte hier fünf Hauptformen erwähnen, welche wie von ATHIAS und FRANÇA, so auch von LEBEDEFF, LAVERAN und MESNIL und anderen Forschern früher beschrieben wurden. Man findet in den großen Blutbahnen wie auch im Herzen und in der Lunge drei verschieden aussehende Trypanosomenformen. Am häufigsten bekommt man die großen plumpen Formen zu sehen, welche von ATHIAS und FRANÇA als *Trypanosoma costatum* beschrieben, bei denen eine deutliche Längsstreifung den ganzen Körper durchzieht und eine feine Granulation das Plasma zwischen den Streifen ausfüllt (Textfig. A).



Textfig. A.

Die undulierende Membran der Trypanosomen ist in ständiger Bewegung begriffen, der Körper selbst aber bewegt sich so langsam, daß man ruhig von einer Unbeweglichkeit des Körpers sprechen

könnte. Viel beweglicher erscheint eine andere Form, die der vorigen sehr ähnlich ist. Wenn man bei der ersten Form die Streifen sich wegdenkt und die gleichmäßige Granulation durch den ganzen Körper gehen läßt, außerdem die undulierende Membran in eine lange Geißel auszieht, so hat man die genaue Beschreibung des zweiten Typus, der von LEBEDEFF als gewöhnliche Form beschrieben wurde.

Die lange Geißel ist in ständiger schneller Bewegung zu sehen. Durch das schnelle Hin- und Herpendeln werden fortwährend neue Stöße an die undulierende Membran abgegeben, diese pflanzen sich auf den ganzen Körper fort, wodurch das Tier zu einer Drehung oder Rotierung gebracht wird. Die wellenartige Bewegung der undulierenden Membran kann in zwei Richtungen verlaufen, wodurch auch die Drehung des Tieres in zwei Richtungen erfolgen kann. Wenn die Wellen von den Blepharoplasten nach oben, zu der Spitze der Geißel verlaufen, wird das ganze Tier von links nach rechts gedreht. Die Bewegung findet eine Zeitlang in der gleichen Richtung

statt, dann hört sie für einige Sekunden auf, die Geißel läßt in der schnellen Bewegung nach, die Wellen wechseln ihre Richtung und fangen an von der Spitze der Geißel nach unten zu verlaufen. Nach der Theorie der Geißelbewegung muß man annehmen, daß das Plasma seine Strömung gewechselt hat, wodurch dann die rotierende Bewegung des Tieres auch die entgegengesetzte Richtung angenommen hat (Textfig. B). (Nach ATHIAS und FRANÇA.)

Außer diesen zwei Typen trifft man in den großen Blutbahnen der infizierten

Frösche noch einen dritten Typus, der durch seine geringe Größe und die schnelle Bewegung sich von den beiden anderen unterscheidet (Textfig. C).



Textfig. B.



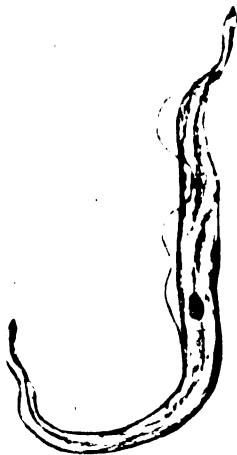
Textfig. C.

Das kleine rundliche Tier, das in der Größe nur wenig die Leucocyten übertrifft, hat ein dünnflüssiges Plasma, welches unmittelbar in die undulierende Membran übergeht und durch die Bewegung der Geißel in Rotation gebracht wird. Von A. MACHADO sind diese Formen öfters bei den brasilianischen Fröschen gesehen worden. Ich

konnte dieselben nur in seltenen Fällen in den Präparaten treffen. Wenn die Auffassung von MACHADO richtig ist, daß diese Formen als Jugendformen im Froschblute entstanden sind, so hätte man sie auch bei unseren Fröschen öfters sehen müssen. Es ist von Interesse, an dieser Stelle die Auffassung des alten Physiologen GAULE zu erwähnen; er läßt diese Typen aus den Leucocyten des Froschblutes entstehen, da er die Entstehung des kleinen Trypanosomentypus aus einer Kugel beobachtet hat. Es gelang ihm zu sehen, wie an einer Seite der Kugel die undulierende Membran sich ein wenig abhob, sich in eine Geißel auszog und das ganze Tier sich mit einer schwachen Drehung zu bewegen begann. Ich kann nicht bestimmt sagen, ob die Trypanosomen im tierischen Körper die Gestalt runder, Leucocyten ähnlicher Kugel beibehalten, ich kann aber mit GAULE bestätigen, daß die kleinen Trypanosomen im infizierten Blut, ganz plötzlich im mikroskopischen Gesichtsfelde auftreten. Es ist schwer denkbar, daß die Jugendformen so plötzlich und in einzelnen Exemplaren im Froschblut auftreten können. Man könnte nach diesen Beobachtungen eher denken, daß die Trypanosomen in dem tierischen Körper als kleine Kugeln zu liegen pflegen, und auf diese Weise gegen den inneren Blutdruck oder giftige Stoffe widerstandsfähig sind.

Außer diesen drei verschiedenen Typen, die man in den Blutbahnen findet, möchte ich noch zwei Typen erwähnen, die aber nur in den Organen des Wirtes gesehen wurden. Der eine Typus wurde von mir ausschließlich in der Niere der infizierten Frösche gesehen und bloß einmal bemerkte ich diese auch im Blute eines Frosches, welcher 3 Wochen in einem Aquarium von 32° C gehalten worden war, und durch hohe Temperatur, sowie Hunger sehr geschwächt war. In den feinen Kapillargefäßen der Niere sind die Trypanosomen von langer und schmaler Gestalt, etwa von 44—50 m Länge und 7—11 m Breite mit einer kammartigen undulierenden Membran an einer Seite versehen, welche mit ihrem Randfaden in die lange Geißel übergeht. Mit dem unteren Pole kleben die Tiere an die Blutkörperchen oder an das Epithel der Nierengefäße und sind daher nur mit der Geißel und der Membran eine Bewegung zu machen imstande. Der Körper dieser Trypanosomen ist gestreift und zwischen den Streifen ist eine feine, der oben bei Typus 1 entsprechenden Granulation zu sehen. In der Niere von stark infizierten Fröschen findet man manchmal eine richtige Anhäufung von solchen Trypanosomen. Bei einem Frosche wurde in einem Tropfen von dem Nierenexsudat 36—40 Individuen gezählt, während in den großen

Blutbahnen kaum 1—2 Individuen der drei erst beschriebenen Typen in einem Tropfen zu sehen waren. Diese Trypanosomen gleichen dem Typus 1 so sehr, daß ich den Nierentypus als ein Teilungsstadium des ersten ansehen möchte (Textfig. D). Neben diesem Typus möchte ich zum Schluß noch einen erwähnen, der infolge seiner auffallend raschen Bewegung gar nicht im Leben untersucht werden kann. Sein flüssiges Protoplasma geht unmittelbar in die undulierende Membran über und durch den Randfaden nach vorn in eine ganz lange Geißel. Wegen der schnellen Bewegung und des ständigen Wechsels der Gestalt sieht das Tier bald lang und schmal, bald rund oder spiralförmig aufgewickelt aus. Es kreist im hängenden Tropfen in größeren Spiralen, bis das Präparat austrocknet (Textfig. E).



Textfig. D.



Textfig. E.

Mit diesen fünf Formen möchte ich die Schilderung der Froschtrypanosomen beschließen. Es gibt sehr viele Übergangsformen, von denen LEBEDEFF sehr schöne Bilder gezeichnet hat, welche aber bald dem einen, bald dem anderen von mir beschriebenen Typen näherstehen. Wenn ich hier von der Auffassung DOFLEIN'S ausgehe, daß alle die Formen zu den Trypanosomen einer Art gehören, so muß wohl die Ursache der Gestaltsverschiedenheit darin zu suchen sein, daß die Parasiten in dem Wirtstiere selbst unter verschiedenen Bedingungen aufgewachsen sind. Von diesem Gesichtspunkte aus drängt sich die Annahme auf, daß die Formänderungen der Trypano-

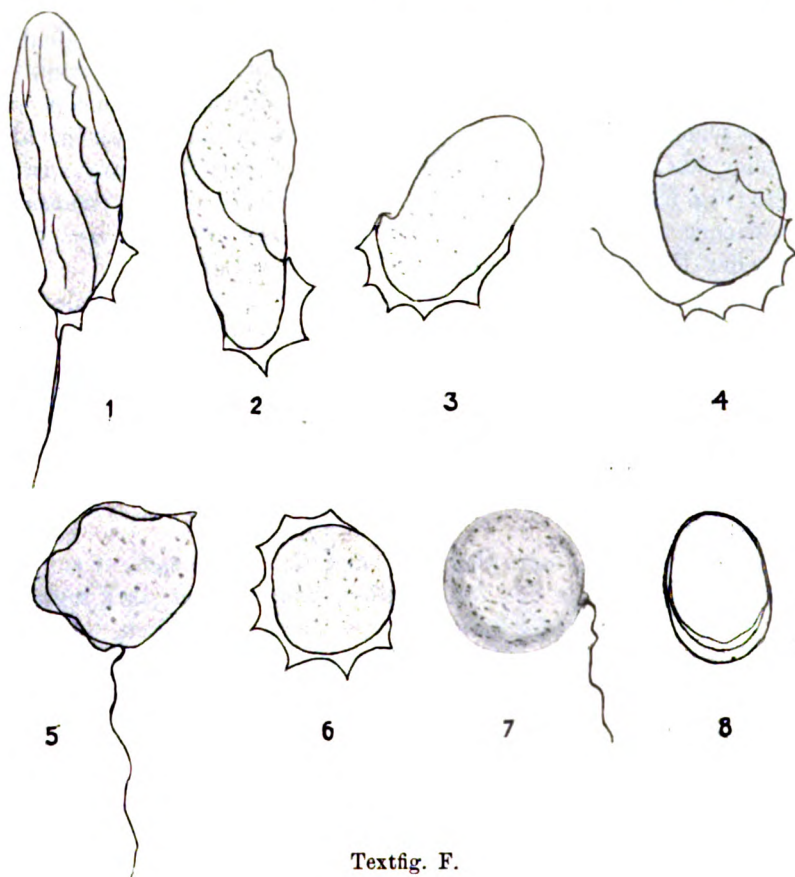
somen im Frosche noch weiter gehen müssen, wenn man entweder die Frösche in ungünstige Lebensbedingungen bringt oder die Aufenthaltsbedingungen der Parasiten durch Einspritzung chemischer Reagenzien in das Blut des Wirtes direkt beeinflußt.

Wenn man einem infiziertem Frosch etwa 1 ccm von 1 proz. Natriumcitratbouillon subkutan einspritzt, tritt beim Frosch, durch Einwirkung des fremden Eiweißes eine temporäre Lähmung der hinteren Extremitäten ein. Während der Dauer der Lähmung wurde das Blut auf Trypanosomen untersucht. Nach 10 minutenlanger Einwirkung der Flüssigkeit sehen die Trypanosomen viel breiter wie gewöhnlich aus, die Streifen weichen immer mehr auseinander, als ob das ganze Tier sich seinen Streifen entlang spalten wollte (Fig. 50—51). Nach zwei Stunden beginnen die Trypanosomen sich wieder zusammenzuziehen und die frühere Gestalt anzunehmen. Auch der Frosch aber beginnt sich von der Lähmung zu erholen, so daß in 24 Stunden der Wirt und der Schmarotzer wieder das frühere Aussehen gewonnen haben. Entsprechende Versuche sind außerdem mit 0,75 proz. und 0,35 proz. physiologischer Kochsalzlösung gemacht worden, aber weder die Frösche noch die Trypanosomen haben irgendwelche Änderungen gezeigt. Dieser Versuch zeigt also, daß die Gestaltsänderung der Trypanosomen eng mit dem Zustande des Wirtes verbunden ist und vielleicht auch durch ihn bedingt wird.

Was geschieht nun aber mit den Trypanosomen, wenn das Wirtstier stirbt? Um das festzustellen, wurden zwei stark infizierte Frösche abgetötet und 24 Stunden im Zimmer gelassen. Nachher wurde das Herzblut tropfenweise entnommen und untersucht. Es zeigte sich, daß die großen Trypanosomen nach 2—3 Stunden der Beobachtung ihre Streifen aufgelöst haben und die Granulation den ganzen Körper gleichmäßig bedeckt hat. Das Plasma schrumpfte allmählich zusammen, bis daß nach weiteren 7 Stunden der ganze Leib sich zu einer Kugel zusammengeballt hat; die undulierende Membran umgab kreisförmig die Kugel wie ein bewegliches Band, welches mit ihren wellenartigen Bewegungen anzeigte, daß das Tier noch lebte. Nach weiteren 17 Stunden war bei der Kugel nur die lange Geißel zu sehen, die undulierende Membran hatte sich um die Kugel so herumgewickelt und an sie angelegt, daß von ihr gar nichts mehr zu sehen war. In 48 Stunden platzte die Kugel und das granuliert Plasma floß auseinander (Textfig. F).

Es ist klar, daß man diese Abkuglung der Trypanosomen als eine Absterbeerscheinung zu bezeichnen hat. Ich konnte solche Ab-

kugelumgung der Tiere einige Male im Froschblute beobachten und im hängenden Tropfen verfolgen, außerdem wurde das Gleiche auch in der Bouillon, in welcher das frische infizierte Froschblut aufgeschwemmt war, gesehen. So kann man hier auch die Behauptung aufstellen, daß die Trypanosomen in vollster Abhängigkeit von dem Wirtstiere sind. So wie sie ihre Gestalt und Form bei der Erkrankung der



Textfig. F.

Frösche wechseln können, so müssen die Parasiten bei dem Absterben des Wirtes auch zugrunde gehen, da sie sich aus den Blutbahnen desselben nicht befreien können. Außerhalb des tierischen Körpers aber kann mit den Trypanosomen zweierlei geschehen: entweder kugeln sich die Tiere ab und gelangen so zum schnellen Absterben oder die großen Formen verwandeln sich in kleine chritidienförmige Gebilde und lassen sich dann lange Zeit forszüchten. Was

diese Züchtung der Trypanosomen anbetrifft, so gelang es zuerst BOUET durch Verwendung von Agar-Nährböden die Tiere zu erhalten. MAC NEAL und NOVY haben dazu einen Blutagar-Nährboden angegeben, der fernerhin von allen Forschern für die Züchtung des *Trypanosoma rotatorium* benutzt wurde. Nachdem ich mich überzeugt habe, daß man mit den großen Froschtrypanosomen keine weiteren Experimente machen könne, da die Tiere starr sind, und nur sehr langsame Gestaltsänderungen zeigen, so habe ich meine besondere Aufmerksamkeit auf die Trypanosomen des künstlichen Nährbodens gerichtet, in der Erwartung, außerhalb des Wirtstieres ganz andersartige und besonders interessante Veränderungen beobachten zu können.

Technik.

Alle Forscher, die sich mit der Züchtung des *Trypanosoma rotatorium* beschäftigt haben, benutzten immer den oben erwähnten MAC NEAL und NOVY Nährboden. Ich habe außer diesen noch andere anzuwenden versucht, um zu sehen, ob die Trypanosomen ihre Gestalt unter dem Einflusse der verschiedenen Mediums wechseln können. Es wurde ein Glycerin-Agar-Nährboden verwendet, der so bereitet war, wie man ihn für bakteriologische Zwecke gewöhnlich benutzt. Zu einer größeren Menge des Fleischgehaltes wurde noch Glycerin zugesetzt, um einen fett- und eiweißreichen Nährboden zu bekommen. Daneben ist der sogenannte Ragit-Agarnährboden benutzt worden, der von der Firma Merk in Darmstadt bezogen wurde. Der Nährboden ist dem ersten gleich, nur ist er glycerinfrei und hat den Vorzug, daß die Vorbereitung dessen sehr einfach ist. Man löst das von Merk bezogene Pulver in einem Liter Wasser auf, sterilisiert es und der Nährboden ist schon gebrauchsfertig. Als dritter Nährboden wurde noch der sogenannte Nährstoff-HEYDEN verwendet, der durch seine Fettarmut ausgezeichnet ist. Alle diese Nährböden sind verschiedentlich mit Kaninchen-, Meerschweinchen-, Ziegen- und Menschenblut gemischt worden. In ein Reagenzröhrchen, das etwa 5—7 ccm hoch mit der Nährflüssigkeit gefüllt war, wurde bei 45° C je ein 1 ccm von dem sterilen defibrinierten Blute zugesetzt, und nach dem Durchschütteln läßt man die Nährböden schief erstarren. Dann läßt man die Röhrchen 24 Stunden in den Thermostaten bei 37° C stehen, was die Absetzung des Kondenswassers begünstigt und außerdem auch zur Prüfung der Sterilität des Bodens notwendig ist. Da es aber noch vorkommen kann, daß einige Luftbakterien in die Nährböden hineingeraten, die sich bei der

gewöhnlichen Temperatur besser entwickeln können, als in der Wärme, so ist ein weiteres 24 stündiges Belassen der Röhren im Zimmer zu empfehlen. Erst nach diesen Vorsichtsmaßregeln sind die Nährböden für die Kulturen verwendbar. Die Kulturen selbst werden folgendermaßen angelegt: Das infizierte Froschblut wird mit einer sterilen, fein ausgezogenen Glaskapillare aus dem Herzen entnommen. Das Blut wird sofort aus der Kapillare in ein kleines Röhren mit einem ccm 1 proz. Natriumcitratbouillon hineingegossen und durchgeschüttelt. Man wiederholt bei einem Frosche einige Male diese Blutentnahme, indem man jedesmal eine andere sterile Kapillare und ein anderes Bouillonröhren nimmt. Wenn man schnell arbeitet, so gelingt es bei einem Frosche 5—6 von solchen Aufschwemmungen zu machen und auf diese Weise $1\frac{1}{2}$ —2 ccm Blut von einem Tiere zu entnehmen, bevor das Froschblut in dem Herzen geronnen ist. Man läßt die Blutaufschwemmungen 24 Stunden im Zimmer stehen. Wenn Bakterien in die Röhren hineingelangt sind, so wird die Bouillon durch das von den Bakterien hämolysierte Froschblut lackfarben rot. Die steril gebliebenen Röhren dagegen müssen ganz klar bleiben, und das Froschblut liegt als ein feiner roter Niederschlag am Boden des Gläschens. Nur letztere Röhren sind für die Kulturen verwendbar. Man schüttelt den Niederschlag und gießt je einen halben ccm in die Blutagar-Nährböden hinein, indem man jedesmal die Ränder der beiden Röhren sorgfältig an der Flamme abbrennen läßt. Nach dieser Methode angelegte Kulturen haben sich monatelang steril erhalten und bloß 8—9 Proz. der gesamten Kulturen waren durch Bakterien verunreinigt. Es ist ziemlich schwer alles zu vermeiden, was die Sterilerhaltung der Kulturen gefährden könnte, man kann aber behaupten, daß die Bakterien in die Kulturen nie aus dem Froschblute, sondern erst sekundär aus der Luft hineingelangen. Das möchte ich hier ausdrücklich betonen, entgegen der Annahme LEBEDEFF'S, daß es sich um aus dem zirkulierenden Froschblut stammende Bakterien handle, welche auf dem Nährboden sich nur langsam entwickelten. Das normale Froschblut, wenn es gleich nach dem Abtöten dem Frosche entnommen wird, ist immer bakterienfrei. Wenn man aber das tote Tier etwa 1—2 Stunden liegen läßt, so findet man die Bakterien nicht nur in den Organen, sondern auch in den Blutbahnen. Die Bakterien durchsetzen bei dem toten Tiere so schnell alle Organe und auch die Blutgefäße, daß es nicht Wunder nimmt, wenn LEBEDEFF bei den toten Fröschen, die er in den Teichen gefunden hat, die Bakterien in dem Blute gesehen hat. Es wurde von mir wiederholt die

Schnelligkeit des Eindringens der Bakterien in die Organe geprüft. Ich konnte feststellen, daß die Bakterien schon nach 10—15 Minuten in der Leber, Niere und Milz sich stark vermehrten. Im Herzen, in der Lunge und den großen Blutgefäßen tritt die große Bakterienansammlung erst nach 1—2 Stunden auf. Für das morphologische und cytologische Studium der Tiere sind die Trypanosomen teils lebend, teils in Dauerpräparaten untersucht worden. Um die morphologischen Änderungen zu beobachten, wurden die Trypanosomen im hängenden Tropfen in vivo nach der von Dr. MANDELBAUM angegebenen Methode, die er für die *Spirocheta pal.* benutzt hat, gefärbt. Die Methode ist sehr schnell und leicht ausführbar und hat sich als sehr praktisch bewährt. Man setze einem Tropfen der Kulturflüssigkeit (oder dem frisch entnommenen infizierten Froschblut) einen kleinen Tropfen LÖFFLER's Methyleneblau gleichzeitig mit einem Tropfen von $\frac{1}{10}$ normaler Natronlauge zu und das Präparat ist fertig. Für die cythologischen Untersuchungen wurden die Ausstrichpräparate immer mit heißer SCHAUDINN'scher Lösung fixiert, wobei nur darauf zu achten ist, daß die Präparate möglichst schnell in die Flüssigkeit kommen, da das Plasma der Tiere sehr schnell an der Luft gerinnt. Am besten kocht man die Flüssigkeit in einer PETRI-Schale auf, in welche die Präparate gleich nach dem Ausstreichen der Kultur hineingeworfen werden, wo sie einige Sekunden bleiben müssen. Die Präparate werden dann in schwache Jod-Alkohollösung, 70 proz. Alkohol, Aqua-Destil. und in die Farbe gebracht. Die Präparate wurden teils mit GIEMSA-ROMANOWSKY oder mit ROSENBUSCH's Eisen-Hämatoxylin (einer für das Kernstudium besonders günstigen Methode) gefärbt.

Kulturen.

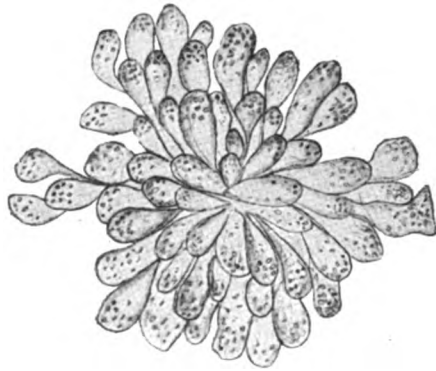
Außerhalb des tierischen Körpers auf allen den obengenannten Nährböden erfahren die Trypanosomen eine derart totale Veränderung der Gestalt, Form und Größe, daß man in den kleinen Flagellaten die ursprünglichen Tiere kaum wieder zu erkennen vermag. Schon am 3. Tage nach der Kulturanlage findet man in allen Agarröhrchen die gleichen chritidienförmigen Individuen, die sich schnell bewegen und durch rasch aufeinanderfolgende Teilung sich stark vermehren. Es wurde zunächst versucht, die Trypanosomen auf einem Agarnährboden, ohne irgendwelchen Blutgehalt zu züchten, aber es stellte sich heraus, daß die Tiere bloß wenige Tage am Leben bleiben. Anders war es bei den Blutagarnährböden. Die

Vermehrung der Trypanosomen ging viel schneller vor sich, und die Tiere nahmen die verschiedensten Formen, je nach den verwendeten Blutsorten, an. Nach dem Verhalten der Froschtrypanosomen zu den vier gebrauchten Blutarten, möchte ich die Kulturen in zwei Gruppen teilen. Der ersten sollen diejenigen Kulturen angehören, die auf Kaninchen- und Meerschweinchenblut gewachsen sind. Und die zweite Gruppe bilden diejenigen, welche auf Menschen- und Ziegenblut gezüchtet waren. Es ist hier aber nicht meine Absicht, die genaue Beschreibung von all den Formen der Kulturtrypanosomen zu geben, da es schon DOFLEIN in seinen experimentellen Studien über die Trypanosomen getan hat. Ich möchte nur auf die morphologische, dem Medium entsprechende Änderungen der Tiere eingehen und auch die Formähnlichkeit derselben mit den Formen aus dem Froschblute hinweisen. Die auf dem Kaninchenblut gezüchteten Kulturen weisen, am 3. Tage nach der Anlage, viele freischwimmende Individuen auf, die mit einer Geißel bewaffnet, schnell den schmalen Körper in der Flüssigkeit des Nährbodens fortbewegen können (Fig. 31—32). Die Trypanosomen machen weiter rapide Teilungen durch. In wenigen Tagen bekommt man eine reiche Trypanosomenansammlung in den Kulturröhrchen. Mit der Vermehrung treten auch Gestalt und Formänderungen der Tiere auf. Neben den freischwimmenden Individuen treten festsitzende, längliche, breite herpetomonasähnliche Formen auf (Fig. 33—34) oder birnförmige und auch ganz runde Individuen (Fig. 35), in deren Körper eine Ansammlung von lichtbrechenden Körnchen zu bemerken ist. Man kann in den kräftigen, sich stark vermehrenden Kulturen, alle möglichen Übergangsstufen von den spirochätenähnlichen bis zu den ganz runden verfolgen, die bald freischwimmend, bald festsitzend sind. Infolge der schnellen aufeinanderfolgenden Teilungen kommt es oft vor, daß die Tochtertiere durch die unvollständige Abtrennung von den Muttertieren an denselben mit dem einen oder dem anderen Pole verbunden bleiben. Das hindert aber die Tiere bei ihrer weiteren Teilung nicht im geringsten, wobei die Teilung immer von dem freien Ende anfangt. Auf diese Weise werden die sogenannten Rosetten gebildet (Textfig. G).

Nach 3—4 monatlicher Züchtung aber tritt ein allmählicher Ausgleich der Form auf, so daß man in den alten Kulturen 5—6 verschiedene Formen der Tiere auffindet, die jetzt dauernd in den Kulturröhrchen erhalten bleiben.

Auf Meerschweinchenblut weisen die Trypanosomen die nämlichen chritidienförmigen Individuen auch am 3. Tage nach der

Kulturanlage auf. Die freischwimmenden Chritidien bleiben aber 15—20 und auch 30 Tage unverändert in den Röhrcchen erhalten, es tritt in dieser Zeit weder eine Teilung noch eine Gestaltsänderung der Tiere auf. Nach 25—30 Tagen fangen die Trypanosomen plötzlich an, sich ganz schnell zu teilen, so daß die Kulturen in wenigen Tagen von Trypanosomen erfüllt erscheinen. Es scheint, daß die Trypanosomen im Meerschweinchenblut Stoffen begegnen, welche ihrem Gedeihen und ihrer Entwicklung hinderlich sind und die sie scheinbar erst nach geraumer Anpassungszeit wirksam zu überwinden vermögen, was sich dann durch die plötzliche reiche Vermehrung ankündigt. Diese Anpassung der Tiere an das Meerschweinchenblut ging in allen sechs Kulturen gleich langsam vor sich. Übrigens spricht für diese Anpassung die bemerkenswerte Tatsache, daß die schließlich an diesen Nährboden angepaßten Tiere einen besonders hohen Grad von Empfindlichkeit gegen andere Flüssigkeiten zeigten. In allen Kulturen wird nämlich bei der langen Züchtung der Trypanosomen das Kondenswasser teils durch die Verdunstung, teils durch die Ernährung der Tiere verbraucht. Um die Kulturen noch länger erhalten zu können, wird das fehlende Kondenswasser mit einigen Tropfen von 1 proz. Natriumcitratbouillon ergänzt. Die Meerschweinchenblutkulturen gehen bei Zusatz von dieser Lösung wie auch von 0,6 proz. physiologischer Kochsalzlösung in wenigen Minuten zugrunde.



Textfig. G.

Die zweite Gruppe, welche die Kulturen des Menschen- und Ziegenblutes bilden, sind dadurch charakterisiert, daß am 3. Tage nach der Kulturanlage neben den chritidienförmigen Individuen eine Form der Trypanosomen auftritt, welche von DOFLEIN als echte Trypanosomform bezeichnet wurde. Auf Menschenblutagarnährboden sind diese echten Trypanosomen kleine 15—20 μ lange Individuen, deren Körper länglich und feingranuliert ist, und eine dünne undulierende Membran von der Mitte des Körpers bis zu der Mitte der Geißel durchgeht (Fig. 36—37). Der Körper ist an seinem unteren Pole, wo eine Granulaanhäufung zu sehen ist, klebrig, und die

Tiere bleiben mit dem Ende am Nährboden oder auch am Deckgläschen haften, während das andere Ende frei mit der Geißel und der undulierenden Membran sich bewegen kann. Nach 5—6 monatlicher Züchtung fangen die kleinen echten Trypanosomen zu degenerieren an, indem sie die undulierende Membran allmählich verlieren, die Herpetomonas- und Chritidiengestalt wieder annehmen, und so mit den anderen Kulturen der ersten Gruppe wieder identisch werden. Hier und da treten im Menschenblutkulturen 45—50 μ lange Individuen auf, die sich einige Zeit in den Röhrchen erhalten lassen. Diese Typen zeichnen sich durch die langsame binäre Teilung, durch die Unbeweglichkeit des Körpers, der mit seinem unteren Pole auch am Nährboden haftet, und durch die bewegliche lange Geißel aus (Fig. 39—40).

Auf Ziegenblutnährboden treten neben den oben beschriebenen Typen schon am 3. Tage die großen echten Trypanosomen auf, die auch 44—45 μ in der Länge und 5—10 μ in der Breite haben (Fig. 38). Der Körper von diesem Trypanosom (in vivo beobachtet) ist zart, fast durchsichtig und enthält keine lichtbrechenden Körnchen, wie der aller anderen Formen. Das dünnflüssige Plasma geht ohne merkbaren Übergang in die undulierende Membran über, welche durch ihre wellenartige Bewegung dem Körper fortwährend Stöße mitteilt und dadurch die Plasmaströmung verursacht. Die Vermehrung der großen echten Trypanosomen geht auffallend langsam vor sich. Die Tiere spalten sich einige Male der Länge nach, die Tochtertiere bleiben neben den Muttertieren liegen und zeigen eine schwache Bewegung am vorderen Körperteil. Nach 14 Tagen verschwinden aber diese großen Trypanosomen aus der Kultur, statt ihrer treten alle anderen Formen auf, darunter auch die kleinen echten Trypanosomen, die wir auf Menschenblutagar gesehen haben. Es ist besonders zu bemerken, daß die großen echten Trypanosomen der Ziegenblutkulturen den anderen Trypanosomen, die wir in der Niere von manchen Fröschen gesehen haben, ähnlich sind. Länge und Breite, Form und Bewegung stimmen durchaus überein, nur zeigen die Kulturtrypanosomen keine Granulation und keine Streifung. Außerdem haben diese zarten Trypanosomenformen weder eine scharf ausgeprägte alveolare Struktur, noch irgend welche Nahrungsvacuolen oder Nahrungspartikelchen im Körper. Wenn diese Trypanosomen dem Nierentrypanosomtypus entsprechen, so besitzen sie doch auf dem künstlichen Nährboden ganz andere Eigenschaften wie in der Froschniere. Während die Trypanosomen im tierischen Körper zur Entwicklung gelangen, da sie dort die ihnen zusagende Nahrung

finden, vermögen sie es auf dem künstlichen Nährboden nicht, so daß die Tiere in kurzer Zeit zugrunde gehen. Nach längerer Züchtung gleichen sich auch die Ziegenblutkulturen mit den anderen aus, indem die echten Trypanosomen aus der Kultur verschwinden. Man kann also diese Einteilung in zwei Gruppen nur bei jungen Kulturen machen, so lange die Tiere noch ihre ursprünglichen Eigenschaften nicht verloren haben und durch den Einfluß des künstlichen Nährbodens noch nicht zur Degeneration gekommen sind.

Bei Betrachtung der morphologischen Veränderungen der Tiere liegt es nahe, in den verschieden gestalteten Tieren nach einer geschlechtlichen Differenz zu suchen. Obgleich aber die Kulturtrypanosomen sich längere Zeit geteilt und vermehrt haben, und die unter sich gleichen Formen derselben sich in der entsprechenden Kultur stets konstant erwiesen haben, so konnte ich doch weder eine geschlechtliche Differenz noch eine Verschmelzung beobachten. Man ist leicht geneigt, die schmalen spirochätenähnlichen Individuen als die männliche Form anzusehen und das daneben liegende Tier, mit dem es an einem Ende verschmolzen ist, als die weibliche. Es ist mir aber nie gelungen, eine Verschmelzung derselben zu beobachten. Es ist zu vermuten, daß diese spirochätenähnlichen Trypanosomen durch heteropole Teilung des großen Muttertieres entstanden sind und ich konnte auch die allmähliche Lostrennung der Tiere voneinander beobachten. Bei längerer Betrachtung der Tiere im hängenden Tropfen kann man beobachten, wie infolge der allmählichen Austrocknung des Tropfens ein Moment eintritt, in welchem das Mutter- und das spirochätenähnliche Tochtertier plötzlich wieder verschmelzen. Bei seinen Untersuchungen wurde LEBEDEFF durch diese Verschmelzung so getäuscht, daß er sie als Befruchtungsvorgang beschrieben hat. Diese falsche Schlußfolgerung erklärt sich daraus, daß er sich auf eine einzige Beobachtung stützt, welche an einem Präparat gemacht wurde, das schon lange unter dem Mikroskope gelegen hatte und daher eben höchst wahrscheinlich dem Austrocknen nahe war. DOFLEIN nennt diese spirochätenähnlichen Formen Hungerformen, eine Bezeichnung, die nicht ganz berechtigt erscheint im Hinblick darauf, daß ich das Auftreten dieser Formen nie in der Kultur beobachten konnte, in welcher das Kondenswasser verdunstet war, bei denen man doch eher berechtigt ist, von Hunger zu reden. Im Gegenteil: in solchen Kulturen treten ganz breite, mit einigen Kernen versehene Formen auf; die freischwimmenden Formen verschwinden auf Kosten der festsitzenden und es ist wohl

nicht denkbar, daß nur die weiblichen Tiere erhalten wurden, indem die schmalen männlichen eher zugrunde gegangen waren.

In dem zarten Körper der Kulturtrypanosomen findet man gewöhnlich einen großen Kern, dem man die ganze vegetative Funktion zugeschrieben hat und außerdem noch einen kleinen, den man als einen Blepharoplasten bezeichnet, dessen Funktion aber bis jetzt noch nicht mit Sicherheit festgestellt ist.

Der Hauptkern der Kulturtrypanosomen ist bläschenförmig, rund, von achromatischer Substanz erfüllt. In der Mitte dieser Substanz oder an eine Seite gedrängt liegt ein kleines, kompaktes, chromatinreiches Korn, das man mit HARTMANN als Caryosom bezeichnet. Die Größe des Kernes bleibt bei den alten und jungen Kulturtrypanosomen ganz gleich. Das Caryosom aber erfährt merkbare Veränderungen mit dem Wachstum und der Vermehrung der Tiere. Die jungen Kulturtrypanosomen haben in den ersten Wochen nach der Kulturanlage ein ganz kleines Caryosom, in dem man keine feinere Struktur erkennen kann (Fig. 1—2). Es ist überhaupt sehr schwer, wie die Struktur so auch die Kernteilung bei den jungen Kulturtrypanosomen zu beobachten, da die Teilung so schnell vor sich geht, daß man weder Mitose noch Spaltung verfolgen kann. Es ist aber möglich, festzustellen, daß die Teilung des Kernes und des Blepharoplasten in zwei Richtungen vor sich gehen kann. Die Kerne können sich sowohl der Länge des Tieres, als auch der Quere nach spalten. Da aber die Teilung des Kernes und des Blepharoplasten nicht immer simultan verläuft, sondern häufig auch jeder Kern für sich die Teilung durchmacht, so sind oft in einem Tiere entweder zwei Kerne neben einem Blepharoplasten (Fig. 3—5) oder zwei Blepharoplasten neben einem Kerne zu sehen (Fig. 6—8). Außerdem kann sich der Blepharoplast z. B. in der Richtung der Längsachse des Tieres spalten, während die Teilung des Kernes in der Querachse vor sich gegangen war (Fig. 9—10); oder auch umgekehrt, daß der Kern in der Längsachse des Tieres seine Teilung durchführte und der Blepharoplast die andere Richtung eingeschlagen hat (Fig. 11—12). Ebenso kann natürlich die Teilung der beiden Kerne im gleichgerichteten Sinne statt haben (Fig. 13—15). Man muß hier betonen, daß die Teilung des Trypanosomenkörpers immer in der Längsachse des Tieres verläuft. Wenn also der Hauptkern sich quer geteilt hat, so wird die Teilung des Körpers dadurch nur verhindert und die Kerne müssen sich entweder nochmals in der Richtung der Längsachse des Tieres teilen und jedem Tochtertiere je zwei Hauptkerne zuteilen oder der Hauptkern muß

eine Drehung um 180° erfahren um auf diese Weise die Längsachse des Tieres zu befreien. So kann man in den Kulturtrypanosomen oft sehen, wie bald der Hauptkern, bald der Blepharoplast die Teilung des Körpers hindern. Andererseits ist zu sehen, daß der in der Richtung der Längsachse geteilte Kern oder Blepharoplast gleich den Beginn der Teilung des Körpers an dem Ende, an welchem die liegen, beeinflussen; auf diese Weise beginnen die Trypanosomen bald an einem Ende, bald an dem anderen sich zu spalten. Wenn die Hauptkerne aber ihre Teilungen etwas langsamer ausführen wie der Blepharoplast, so spaltet sich die Geißel mit dem vorderen Körperteile einige Male durch und so werden Individuen gebildet, die bei Besitz von einem oder zwei Kernen mehrere fächerartig angeordnete Geißeln aufweisen, denen ebenso viele Blepharoplaste entsprechen.

In den 3—4 monatlichen Kulturen, wo die Tiere ihre Teilung nicht so schnell durchführen, nimmt auch die Kernteilung in der Geschwindigkeit ab, so daß man wie die Struktur so auch den Teilungsprozeß der Kerne einigermaßen beobachten kann. Das Charakteristische für die alten Kulturen ist, daß der Blepharoplast näher an den Kern rückt und manchmal selbst innerhalb der Kernkontur zu liegen scheint. Beim Beginn der Teilung prägt sich in der Mitte des Caryosoms ein heller, gefärbter Binnenraum aus, in welchem ein dunkel gefärbtes Korn zum Vorschein kommt, welches man mit HARTMANN als ein Centriol bezeichnen kann. Das Centriol deutet gewöhnlich die Teilung des Kernes an in der Weise, wie es PROWAZEK bei den anderen Trypanosomen geschildert hat, indem es sich in die Länge zu einer hantelförmigen Gestalt auszieht, dadurch die umliegende chromatische Substanz des Caryosoms auflockert und auch zur Teilung zwingt (Fig. 21—22). Schließlich wird das ganze Caryosom in eine Mitose ausgezogen (Fig. 23) und die weitere Teilung erfolgt wie gewöhnlich, indem die chromatische Substanz sich mitotisch teilt und die achromatische in gleichen Hälften den beiden Tochterkernen mitgibt. Wenn aber das Caryosom die angegebene hantelförmige Gestalt nicht angenommen hat, so kann es verschiedene Dimensionen in dem bläschenförmigen Kerne annehmen. Es kann vorkommen, daß das Caryosom den ganzen Kern seiner chromatischen Substanz ausfüllt, so daß keine achromatische Substanz zu sehen ist (Fig. 25—26). Es kann sich aber, durch den inneren Druck vermutlich getrieben, in kleine Bröckchen zersplittern, welche sich im Kreise an den Rändern des Kernes verteilen (Fig. 27—28). Die beginnende Centriolenteilung

ist sehr schwer festzustellen, wenn dasselbe in der Mitte des Caryosoms liegt und eng von der chromatischen Substanz derselben umschlossen ist. Anders ist es, wenn das Centriol seine Lage außerhalb des Caryosoms, einfach in der achromatischen Substanz des Kernes einnimmt. Da kann man auch deutlich sehen, daß das Centriol das leitende Element in der Kernteilung ist, da es auch außerhalb des Caryosoms die Teilung anfängt. Diese merkwürdige Lage des Centriols wurde auch von früheren Autoren bei den Trypanosomen anderer Art gesehen. Wenn HARTMANN, JOLLOS, PROWAZEK und andere Autoren dieses kleine Korn als ein Centriol gedeutet haben, so wird er von KÜHN und SCHUCKMANN, von WASSILEVSKI und HIRSCHFELD als ein Randkörper beschrieben, welcher „vor der Teilung des Gesamtkernes seine Teilung durchmacht, und dessen Hälften dann an die Teilungspole des Kernes heranrücken und in die Tochterkerne gelangen“. Nachdem ich aber in den nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten das Centriol in der Mitte des Caryosoms gesehen und die Teilung dessen vor der Teilung des Caryosoms beobachtet habe, so bin ich geneigt, mit HARTMANN das kleine Korn außerhalb des Caryosoms als identisch mit dem ersten zu bezeichnen.

Bei der Beschreibung des Körperbaues der Tiere ist hier die charakteristische alveolare Struktur zu betonen, die an dem unteren breiteren Pole des Tieres durch große Vacuolen verdeckt ist, während nach der Geißel zu die wabige in eine homogene Struktur der Geißel und der undulierenden Membran übergeht. Bei den jungen chitidienförmigen Trypanosomentypen wurde nur eine kleine Zahl der Vacuolen an dem breiteren Pole gezählt, in den älteren Kulturtrypanosomen dagegen wird das ganze Plasma von Vacuolen durchsetzt, in welchen größere und kleinere lichtbrechende Tröpfchen zu sehen sind. Allmählich wird das ganze Plasma des ganzen Tieres in lauter Vacuolen umgearbeitet und es werden auch hie und da in der Geißel selbst die lichtbrechenden Körnchen gefunden. Diese auffallende Vacuolisierung des Plasmaleibes der Kulturentrypanosomen hängt wohl innig zusammen mit den allgemeinen Gestaltsveränderungen, welche aber ihre letzte Ursache wahrscheinlich in den völlig anderen Nahrungs- und Osmoseverhältnissen finden.

Ernährung.

Wenn man die Kulturtrypanosomen lebend in dem hängenden Tropfen betrachtet, so fallen sofort die lichtbrechenden Körnchen auf, welche in den Vacuolen aufgespeichert sind. DOFLEIN hat diese

lichtbrechenden Körnchen untersucht und als Fettkörperchen bestimmt, da dieselben sich mit Sudan III rot gefärbt haben. Diese Fettkörnchen werden wie in den jungen, so auch in den alten Kulturtrypanosomen gefunden, nur ist ihre Anzahl bedeutend verschieden. Während man bei den jungen chritidienförmigen Tieren 3—4 kleine Tröpfchen findet, sind die älteren Individuen fast vollständig mit dem Fette erfüllt, so daß viele ihre Bewegungsfähigkeit einbüßen, bis man nur an dem schwachen Pendeln der Geißel erkennen kann, daß die Tiere am Leben sind. Hie und da aber treten in den Kulturen Individuen auf, die keine Fettkörnchen in dem Plasma aufweisen, und zwar sind das die großen echten Trypanosomen der Ziegenblutkultur, welche weder die wabige Plasmastruktur zeigen, noch die Fettvacuolen erkennen lassen und nur eine kurze Zeit auf dem Nährboden leben können. Es ist klar, daß die Fettkörnchen als Reservestoffe in dem Trypanosom aufgespeichert sind. Ob mehr oder weniger Fett in den Tieren vorhanden ist, hängt erstens von der allmählichen Anpassung der Trypanosomen an den künstlichen Nährboden und außerdem von dem Fettgehalte des Nährbodens selbst ab. Auf dem glycerinhaltigen Nährboden z. B. haben die Trypanosomen größere Fettaufspeicherung in den Vacuolen aufgewiesen wie auf dem glycerinfreien, z. B. HEYDEN-Nährstoff oder RAGIR-Nährboden gezüchtete Tiere. Auch haben auf Menschenblut gezüchtete Trypanosomen einen größeren Fettgehalt als die auf Meerschweinchen- und Ziegenblut gehaltenen Tiere. Es ist also ersichtlich, daß die Nahrungsstoffe direkt dem Medium entzogen und in den Trypanosomen aufgespeichert werden. Es fragt sich nur, ob die Fettansammlung etwas den Kulturtrypanosomen Spezifisches ist? Wenn man die großen vegetativen Froschtrypanosomen in dem frisch entnommenen Blutstropfen nach Zusatz eines Tropfens Sudan III im hängenden Tropfen betrachtet, so sieht man feine, rot gefärbte Körnchen zwischen den Streifen des Tieres in großer Menge aufgespeichert liegen (Fig. 44). Man bemerkt aber sofort, daß die kleinen Granula kompakt und nicht lichtbrechend sind. Außerdem sind die Körnchen nicht in den Vacuolen eingeschlossen, sondern im ganzen Körper zerstreut, sie dringen in alle Falten des Körpers ein und nur die Geißel und die undulierende Membran, welche noch lange nach der vitalen Färbung mit Sudan III ihre Bewegungsfähigkeit beibehalten, bleiben von Granula frei. Da die Lichtbrechung nur die flüssigen Fette bei der mikroskopischen Betrachtung geben, so müssen die nicht lichtbrechenden Körnchen der großen Trypanosomen als feste Fette angesehen werden. Indem sich in bezug auf das

Fett der Kultur- und der vegetativen Trypanosomenformen wichtige Unterschiede vorfinden, so ergibt sich, daß die physiologischen Vorgänge im Trypanosoma mit der Gestaltsänderung in Korrelation stehen. Außer den beschriebenen morphologisch-physiologischen Unterschieden der Fette in den Blut- und Kulturtrypanosomen, ist auch ein verschiedenes Verhalten der beiden Fettarten gegenüber den physikalischen (Temperatur) und chemischen Einflüssen bemerkenswert. Während die festen Körnchen der blutbewohnenden Formen durch die höhere Temperatur von 37—38° C nicht verändert werden, erreichen die in den Vacuolen der Kulturtrypanosomen vorhandenen Fettstoffe ihren Auflösungspunkt schon bei der Temperatur zwischen 36 und 37° C. Während die Fette der Kulturtrypanosomen mit Leichtigkeit in Chloroform, Äther, Äther + Alkohol, Alkohol absolut. aufgelöst werden, erfolgt dagegen die Auflösung der festen Körnchen bei den lebenden großen Bluttrypanosomen sehr langsam und nicht immer vollkommen. Beide Fettarten werden aber durch Osmium oder auch Osmiumdämpfe geschwärzt. Es ist deswegen nicht zu empfehlen, die Ausstrichpräparate mit Osmiumdämpfen zu fixieren, da die Fettkörnchen als kleine schwarze Klümpchen mitfixiert werden. So erklärt sich der Irrtum LEBEDEFF'S, der sie für Chromidialkörner hielt. Nach UNNA'S und GOLODETZ'S Untersuchung der organischen Fette sollen unter ihnen nur die Ölsäuren und die Ölsäureverbindungen das Vermögen der Osmiumsäurereduktion zeigen. Auch soll nach den Fettuntersuchungen von RINXA KAWANNURA die Ölsäure eine spezifische Färbereaktion geben, wenn man sie mit Nilblau oder Neutralrot färbt. Die Fette der Kulturtrypanosomen geben also die charakteristische Sudan III (orangerote), Färbung, lassen sich rot mit Neutralrot und blau mit Nilblau färben, außerdem weisen sie auch keine doppelte Lichtbrechung auf und sind als flüssige Tröpfchen aufgespeichert, woraus man auch schließen kann, daß es Fette der Oleinsäuregruppe sind. Es fragt sich weiter, ob die Fette der Bluttrypanosomen zu den Fetten derselben Gruppe zugehören? Die Fette weisen nämlich keine Lichtbrechung auf, woraus ich schließen möchte, daß sie in den Tieren in einem festen Zustande sich befinden, aber trotzdem die gleiche Farbenreaktion wie die Kulturtrypanosomenfette liefern. Die gleiche Farbenreaktion geben aber auch die Lecithine, mit denen man die Fette in Beziehung bringen könnte. Andererseits aber hat ARTUR MEYER (1912) bewiesen, daß die „Lecithine nie als Reservestoffe dienen“ können. So möchte ich nur die Vermutung aussprechen, daß die festen Fette der Froschtrypanosomen als Oleinsäureverbindungen in den Tieren

aufgespeichert liegen. Es ließe sich noch die Frage aufwerfen, ob man die Fette der Trypanosomen nicht als Degenerations- und Absterbeprodukte der Zelle auffassen könne, wie es RÖSSLE für die Amöben behauptet hat; doch im Hinblick auf alles oben Gesagte ist diese Frage wohl ohne weiteres zu verneinen, da es auch a priori undenkbar ist, daß die sowohl bei den Kulturtrypanosomen als auch bei den vegetativen Froschtrypanosomen sich zeigenden Fettkörperbildungen als degenerative Verfettung erklärt werden könnten. Besonders klar können wir die Bedeutung der Fette als Nahrungs- und Reservestoffe noch aus dem Umstande erkennen, daß die Trypanosomen, welche keine Fettgranula im Körper haben, nicht lange in den Kulturen erhalten bleiben, und daß auch eine zu geringe Menge von Granula, bei ungünstigen Kulturbedingungen, d. h. wenn die Kulturen in einer niedrigen, der Entwicklung nicht förderlichen Temperatur oder auf einem Nährboden, wo kein Kondenswasser mehr vorhanden war, gehalten wurden, die Vernichtung der Tiere herbeiführte. Nur diejenigen Trypanosomen, die eine größere Ansammlung von den Granula hatten, ließen sich eine längere Zeit auf den gegebenen Nährböden erhalten. Die verschiedenartigen Fette der Kultur und der vegetativen Trypanosomenformen sind nur als Folgen des verschiedenen Mediums aufzufassen. Diese Tatsache gibt uns den besten Beweis von der großen Anpassungsfähigkeit der Tiere sowohl an die organischen Stoffe des Wirtes, als auch an die künstlichen Nährböden. Nachdem es sich also gezeigt hat, daß die Froschtrypanosomen aus dem Blut und die Kulturtrypanosomen sehr ähnliche Nahrungs- und Reservestoffe verbrauchen und nachdem die Kulturtrypanosomen auf allen gegebenen Nährböden sich reichlich vermehrt und große Anpassungsfähigkeit gezeigt hatten, wollte ich dieselben wieder in den tierischen Körper zurückbringen, um sie wieder an die ursprünglichen Verhältnisse zu gewöhnen.

Tierversuche.

Durch die Anregung von Prof. DOFLEIN und durch die Versuche von WENDELSTÄDT und FELLNER, denen es gelungen war, das *Trypanosoma lewisi* von Warmblütern auf Kaltblüter zu übertragen veranlaßt, wollte ich auch das *Trypanosoma rotatorium* an das Blut von Kaltblütern anpassen und dann allmählich von einem Tier auf das andere die Impfungen durchführen. Die Kulturtrypanosomen wurden zunächst den Kaltblütern eingepflegt, und zwar folgenden: *Bufo vulgaris*, *Rana esculenta*, *Rana temporaria*, *Hyla arborea*, *Bombinator*, *Salmo*

fario und Kaulquappen von *Rana temporaria*. Schließlich versuchte ich auch die Impfung an Warmblütern, und zwar wählte ich Meer-schweinchen und Kaninchen dazu.

Eine reich wachsende Kultur wurde zunächst in 1 proz. Natrium-citratbouillon aufgeschwemmt, durch Mischung der gleichen Menge von Kondenswasser der Kultur und von Bouillon. Die Aufschwemmung ließ ich 24 Stunden im Zimmer stehen, um mich zu überzeugen, daß die Trypanosomen durch die Bouillon nicht gelitten hatten und auch keine Bakterien hineingekommen waren. Einer *Bufo vulgaris* wurden 0,5 ccm von der Trypanosomenaufschwemmung subkutan mit einer feinen Impfnadel eingepfht. In 24 Stunden prüfte ich das Blut der Kröte, aus der Fingerspitze entnommen, auf Trypanosomen. Da man aber keine Trypanosomen finden konnte, wurde die Impfung zum zweiten Male wiederholt, um nach den weiteren 24 Stunden zum dritten Male zu impfen. Dann wurde die Kröte getötet und sorgfältig alle Organe, so auch die großen Blutgefäße untersucht, aber es war nirgends eine Spur von den Trypanosomen zu sehen. Bei der zweiten *Bufo vulgaris* wurde die Impfung anders durchgeführt, und zwar so, daß 0,5 bis 1 ccm von der Aufschwemmung mit einer fein ausgezogenen Capillare dem Tiere einverleibt wurde, indem man vorher mit der Schere ein kleines Loch in die Haut der Kröte geschnitten hat. Nach fünf Minuten wurde die erste Probe mit einer Platinöse aus dem Loche entnommen und gleich im hängenden Tropfen untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Trypanosomen ihre Bewegung eingebüßt hatten und nur die schwache Bewegung der Geißel zeigte, daß die Tiere nicht tot waren. Nach weiteren 5 Minuten wurde wieder eine Probe entnommen und nun zeigte sich, daß die Trypanosomen vollständig gelähmt waren und nach dem Verlaufe von weiteren 5—10 Minuten hatten sich die Tiere in der Kröte abgerundet und manche fingen auch an, sich aufzulösen. Nach 24 stündiger Einwirkung war von den Trypanosomen nichts mehr zu finden und nun wurde in die gleiche Öffnung der Haut eine frische Trypanosomenaufschwemmung hereingegeben. Die Kulturtrypanosomen wurden aber in gleicher Weise in 5—15 Minuten vollständig abgetötet. Da man vermuten konnte, daß die Trypanosomen durch das Sekret der Hautdrüse der Kröte getötet worden waren, so wurde die Impfung bei weiteren zwei Kröten interperitoneal durchgeführt. Es wurde 1 ccm der Aufschwemmung den Kröten im Abstände von je 3 Tagen eingepfht. Nach der vierten Impfung wurden die infizierten Kröten getötet und auf Trypanosomen untersucht. Man konnte wieder keine, weder in den Organen noch in

den großen Blutbahnen, finden und es ist deswegen zu vermuten, daß die Tiere durch die Peritonealflüssigkeit in der gleichen Weise abgetötet wurden, wie es bei der subkutanen Impfung geschehen war.

Die gleichen Impfungen und mit dem gleichen Mißerfolg wurden ausgeführt bei *Rana esculenta* und *Rana temporaria*, die längere Zeit auf Trypanosomen geprüft waren. Die Frösche wurden zunächst subkutan, dann interperitoneal geimpft und in beiden Versuchen sind die Trypanosomen abgetötet und aufgelöst worden. Bei einem der behandelten Frösche wurden in der Niere große gestreifte Trypanosomen gefunden, die aber nicht von der künstlichen Infektion der Kulturtrypanosomen herstammten, sondern in dem Gewebe der Niere schon vor der Impfung verborgen gesteckt haben müssen. Es zeigt nur, wie schwer es zu konstatieren ist, ob die Frösche trypanosomenfrei sind oder nicht. Nach diesen Versuchen nahm ich eine Impfung nach der PFEIFFER'schen Methode vor. Die interperitoneale Impfung wurde mit einer dicken Nadel ausgeführt und mit dieser wurden sofort Proben wieder entnommen. Dieser Versuch gab mir die Möglichkeit festzustellen, daß die Trypanosomen durch die peritoneale Flüssigkeit in 5 Minuten vollständig abgetötet werden und in weiteren 10 Minuten war schon keine Spur mehr in dem Exsudate zu sehen. Weitere Impfungen wurden an den kleinen Anurenarten gemacht, und zwar *Hyla arborea* und *Bombinator*. Die Tiere (drei von jeder Art) wurden mit einer Trypanosomenaufschwemmung von 0,5 ccm in einem Zeitabstand von je 4 Tagen dreimal subkutan geimpft. 24 Stunden nach der dritten Impfung wurden zwei von den Tieren getötet und auf Trypanosomen geprüft. Da man aber nichts von den Parasiten finden konnte, so wurden die anderen übrig gebliebenen Tiere noch zweimal interperitoneal mit der Aufschwemmung geimpft und dann auch getötet. Die Impfungen sind mit den verschiedenen Modifikationen noch zweimal wiederholt worden, und zwar immer mit den nämlichen negativen Resultaten. Nachdem die Impfungen an Bachforellen auch mit einem Mißerfolge geendet hatten, wollte ich die Tiere direkt in die Blutbahnen der Warmblüter übertragen, auf deren Blute die Kulturtrypanosomen so gut gewachsen waren. Zunächst versuchte ich die Impfung bei Meerschweinchen zu machen. Es wurde 1 ccm Trypanosomenaufschwemmung interperitoneal nach der früher erwähnten PFEIFFER'schen Methode eingeimpft. Die Versuchsproben wurden sofort im hängenden Tropfen untersucht. Bei sofortiger Entnahme konnte man noch einige Trypanosomen sehen, aber in 5 Minuten schon nicht mehr. Endlich wurde noch folgende Vorbereitung für

die Impfung der Warmblüter vorgenommen. Die Kulturen wurden in höherer Temperatur gezüchtet, um die Parasiten an die Körpertemperatur der Warmblüter allmählich zu gewöhnen. Zunächst wurden die infizierten Frösche etwa 2—3 Wochen in einem Aquarium von 32° C gehalten, dann die von dem Blut dieser Frösche angelegten Kulturen in einem Thermostaten von 25° C, dann etwa 2—3 Wochen in einem anderen von 32° C weiter gezüchtet. Diese sich reichlich vermehrenden Kulturtrypanosomen wurden in das Peritoneum eines Meerschweinchens und in die Ohrvene eines Kaninchens eingepflegt. Beide Versuche endeten aber auch mit einem Mißerfolge. Nachdem es also erwiesen war, daß die Kulturtrypanosomen trotz der großen Anpassungsfähigkeit der Tiere sich doch nicht an den tierischen Körper wieder anpassen können, wollte ich die Ursache dieser Erscheinung feststellen, und die Tiere weiter in den verschiedensten Bedingungen des Druckes und der Temperatur halten.

Temperatur.

Die Kulturtrypanosomen wurden gewöhnlich in Zimmertemperatur gezüchtet. Die niedrige Temperatur des Eisschranks übt auf die Trypanosomen aber auch keinen schädigenden Einfluß aus und so sind auch die Schwankungen der Zimmertemperatur auf die Kulturen nicht von Bedeutung. Bei 0° bleiben die Tiere längere Zeit unverändert am Leben, nur hört die Teilung und die weitere Vermehrung allmählich auf. Wenn die Kulturen wieder ins Zimmer gebracht werden, so fängt die rapide Teilung von neuem an. In höherer Temperatur, in einem Thermostaten von 25° C können die Trypanosomen sich reichlich vermehren. Es ist aber zu beachten, daß die Trypanosomen sich allmählich mehr abrunden und auch mehr Fett in sich aufspeichern. Nach einiger Zeit, nachdem sich die Trypanosomen an die Temperatur von 25° C gewöhnt hatten, wurden die Kulturen in den Thermostaten von 32° C übergeführt, wo die Vermehrung noch weiter andauerte. Nach 14 Tagen wurden die Kulturröhrchen in den Brutschrank von 37° gebracht. Da gingen aber die Kulturen in 24 Stunden alle ein. Die Fette wurden aufgelöst und die Trypanosomen verschwanden vollkommen aus den Kulturen. Der Versuch wurde wiederholt, indem die infizierten Frösche und nachher die Kulturen in den einzelnen Thermostaten länger gehalten werden. Bei der Temperatur von 37° aber wurden die Trypanosomen in derselben Weise wie vorhin aufgelöst. Diese Versuche haben also die Ursache gezeigt, warum die Impfungen bei den Warmblütern mißlingen mußten. Es fragt sich nun, aus welchen

Gründen die Impfungen an Kaltblütern auch mißlingen? Eine Möglichkeit wäre die gewesen, daß die zarten Kulturtrypanosomen durch den mechanischen großen Druck der tierischen Blutströmung einfach zerrieben wurden. Bei der Kulturführung hat sich nämlich die große Empfindlichkeit der Tiere gegen jeden osmotischen Druck gezeigt. Wenn man in ein Kulturgläschen einige Tropfen Bouillon oder 0,75 proz. physiologische Kochsalzlösung hereinbringt, wurde die Kultur nicht geschädigt, jedoch bei Zusatz von etwa 1 ccm der Flüssigkeit lösten sich die Kulturen völlig auf. Ich habe früher schon die Meerschweinchenblutkulturen erwähnt, die überhaupt keinen Zusatz einer fremden Flüssigkeit von anderem osmotischen Druck vertragen können. Die anderen Kulturen aber können sich den fremden Flüssigkeiten gegenüber, je nach der Konzentration und Menge der letzteren verschieden verhalten. Es wurde eine Ausfiltrierung der Flüssigkeiten gemacht, indem in die verschiedenen Mengen der verschiedenen Flüssigkeiten je ein Tropfen der Kulturflüssigkeiten hineingebracht wurde. Es zeigte sich, daß die Trypanosomen bei 15facher Verdünnung mit 0,75 proz. physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst werden. Bei 0,3 proz. physiologischer Kochsalzlösung genügt aber schon die 8fache Verdünnung (tropfenweise gemessen), um die Trypanosomen zur Auflösung zu bringen, beim gewöhnlichen Leitungswasser genügt die 4—5fache Verdünnung; 1 proz. Natriumcitratbouillon dagegen löst die Trypanosomen erst in 20—25facher Verdünnung auf. Nach dieser Feststellung der außerordentlichen Empfindlichkeit der Kulturtrypanosomen gegen abnorme osmotische Bedingungen schien es auch möglich, daß das ungünstige Mengeverhältnis der eingeimpften 0,5 ccm Kulturflüssigkeit zu der Quantität Blut im lebenden Frosch und die dadurch bedingte plötzliche Ausgleichung des osmotischen Druckes in beiden Flüssigkeiten die Trypanosomen in baldige Auflösung bringt. So hätte man das Mißlingen der Versuche an Kaltblütern nur mechanischen Bedingungen, d. h. dem stärkeren osmotischen Drucke des tierischen Körpers zuschreiben können; wenn ich nicht folgende Versuche angestellt hätte, die wieder ganz andere Ursachen klarlegten.

Immunität.

Es wurden nämlich gleiche Mengen von Kulturflüssigkeit mit frisch entnommenem Tierblute gemischt. Es stellte sich heraus, daß die Trypanosomen weder in dem Blute von *Bufo vulgaris*, *Hyla arborea*, Unken, Forellen, Blutegeln noch in dem Blute von Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen und Menschen aufgelöst oder irgendwie verändert

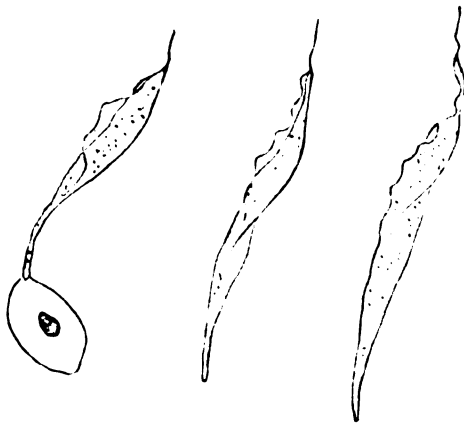
werden. In dem Blute der infizierten *Rana esculenta* und *Rana temporaria* werden die Trypanosomen aber sofort gelähmt und in wenigen Minuten vollständig aufgelöst. Diese interessante Tatsache ist immer wieder leicht festzustellen, wenn man einem Tropfen der Kulturflüssigkeit einen Tropfen Froschblut zusetzt und gleich im hängenden Tropfen untersucht. Es ist klar, daß da bei dem Auflösen der Tiere keine osmotischen Druckdifferenzen mitspielen konnten und entstand gleich die Frage, ob nicht die Immunität der erwähnten Frösche die Hauptrolle beim Mißlingen der Infektionsversuche gespielt habe? Um diese Frage zu entscheiden, wurden folgende Versuche angestellt. Das Blut eines infizierten Frosches wurde in fein ausgezogenen Capillarröhrchen aufgefangen, die Capillaren unten an der Flamme zugeschmolzen und zentrifugiert, um auf diese Weise das Serum zu gewinnen. Ein Tropfen des Serums wurde mit einem Tropfen der Kultur gemischt und es zeigte sich, daß das Froschserum die gleiche abtötende Kraft auf die Trypanosomen ausübt wie das frische Froschblut selbst. Das zentrifugierte Froschblut wurde dann weiter samt der Capillare auf eine halbe Stunde in den Thermostaten von 60° C gestellt. Nach dem Verlaufe dieser Zeit wurde wieder ein Tropfen von dem Serum mit der Kultur gemischt und das Froschserum konnte nun die Trypanosomen nicht mehr auflösen.

Die vor dem Erwärmen wirkenden Stoffe sind also durch die höhere Temperatur zerstört und hiermit das Serum selbst inaktiv gemacht. Die vielfach wiederholten Versuche mit dem aktiven und inaktiven Froschblut haben auch klargemacht, daß die abtötenden Stoffe spezifische Antitrypanosomen Immunstoffe sind, die nur auf die Kulturtrypanosomen, nicht auf die großen Froschtrypanosomen ihre abtötende Kraft auszuüben vermögen. Es wurde weiter versucht, die zerstörten Stoffe des inaktivierten Froschblutes mit dem Blute von solchen Tieren zu ergänzen, in deren Blut die Kulturtrypanosomen an und für sich nicht aufgelöst werden, und zwar mit dem frisch entnommenen Meerschweinchenserum. Dabei stellte sich heraus, daß das inaktivierte Froschblut seine aktive Kraft wiedergewinnt, wenn man zu einem Tropfen des inaktivierten Froschblutes einen Tropfen von dem Meerschweinchenserum zusetzt. Mit anderen Worten, das inaktivierte Froschblut läßt sich durch das Meerschweinchenserum reaktivieren. Die Antitrypanosomenstoffe sind also keine auf Trypanosomen spezifisch wirkende Antitoxine, da sie sich durch das normale Blut vom Meerschweinchen ergänzen lassen. Es ist in der Serologie anerkannt, daß Meerschweinchen

sehr viele Alexine (Komplemente) in ihrem Blute haben, und da das inaktivierte Froschblut sich durch das Meerschweinchenserum reaktivieren läßt, so möchte ich die thermolabilen Antitrypanosomenstoffe des Froschblutes der Gruppe der Amboceptoren zurechnen. Diese wiederholt gemachten Versuche mit aktivem, inaktivem und reaktivem Blute, bei denen die fehlende Alexine der Kaltblüter sich durch die Alexine der Warmblüter ergänzen ließen, geben den besten Beweis dafür, daß die Immunstoffe der Kaltblüter ganz identisch mit denen der Warmblüter sind. Die Wirkung der Kaltblüteralexine scheint auch von bedeutender Stärke zu sein, da die Stoffe, in geringer Menge verwendet, die Kulturtrypanosomen abzutöten vermögen. Das aktive, stark infizierte Froschblut von *Rana esculenta* kann sogar in 200 facher Verdünnung die Kulturtrypanosomen abtöten oder wenigstens lähmen: man kann aber die Verdünnungen des verdünnten Froschblutes so weit führen, daß die Trypanosomen nicht mehr aufgelöst werden, dann wird das verdünnte Froschblut mit dem inaktiviertem Froschblut zu gleichen Teilen gemischt und ein Tropfen von der Mischung einem Tropfen der Kulturtrypanosomen im hängenden Tropfen zusetzt. Es zeigte sich dann, daß die beiden Lösungen, die jede für sich die Trypanosomen nicht lösen können, zusammen die frühere aktive, abtötende Kraft wiedergewonnen haben. Diese Befunde stellen das beste Beispiel für die Komplemente dar, die im Vergleich mit den Fermenten, auch ganz spezifisch wirken können. Es fragt sich aber, wann die Immunstoffe auf die Kulturtrypanosomen und nicht auf die großen vegetativen Formen abtötend wirken? Es ist klar, daß diese Trypanosomen in dem Körper des Tieres eine größere Widerstandsfähigkeit besitzen müssen, um den starken Immunstoffen zu widerstehen. Außerdem scheint es auch, daß die Immunstoffe und die Gegenstoffe der beiden Tiere sich ausgleichend miteinander angepaßt haben und so unschädlich für die beiden sind. Wenn die Frösche eine natürliche, d. h. erbliche Immunität gegen die Trypanosomen besäßen, wären auch die Trypanosomen erblich übertragbar und auch die Kaulquappen müßten die gleiche lösende und abtötende Kraft auf die Kulturtrypanosomen ausüben. Die Kaulquappen, welche ich für meine Versuche verwendete, wurden in dem Aquarium des zoologischen Institutes aufgezogen, so daß sie von außen nicht mit Trypanosomen infiziert werden konnten. Wenn man einen Tropfen Kulturflüssigkeit mit der gleichen Menge Kaulquappenblutes im hängenden Tropfen mischt, so werden die Trypanosomen durch das Blut nicht abgetötet, und in dem Kaulquappenblute selbst sind nie

vorher Trypanosomen gefunden worden. Nachdem ich mich also überzeugt hatte, daß das Kaulquappenblut die Trypanosomen im Vitro nicht auflösen könne, wurden Impfungen an Kaulquappen vorgenommen. Den Tieren wurden je 0,1 ccm Kulturflüssigkeit (ohne Bouillonzusatz) eingepft. Die Kaulquappen vertragen die Impfungen sehr gut und nur etwa 6—7 Proz. der Tiere gingen infolge stärkerer Verletzungen ein. Nach 6 Tagen wurden einige Kaulquappen untersucht. In den Organen der Tiere konnte man keine Trypanosomen wiederfinden; in dem Blute des Herzens aber sind die Trypanosomen wieder zum Vorschein gekommen, und zwar Individuen von schlanker, langer Gestalt, genau wie die Form der großen echten Trypanosomen des Ziegenblutes. Nach 8 Tagen, nach 10 und 14 Tagen wurden die Trypanosomen immer wieder im Herzblut der Kaulquappen gefunden. Nach 14 Tagen aber haben die Kulturtrypanosomen eine lange Form angenommen, eine deutliche undulierende Membran und auch eine lange Geißel ausgebildet. Mit dem unteren Pole bleiben die Tiere an den Blutkörperchen haften

und die Bewegung ging nur von der Geißel und der undulierenden Membran aus (Textfig. H).



Textfig. H.

Durch diese Versuche wurde klargelegt, daß das Kaulquappenblut weder in vitro noch im tierischen Körper selbst die abtötende Wirkung auf die Kulturtrypanosomen auszuüben vermag. Da die Kaulquappen aber in dem Aquarium des Zoologischen Institutes aufgewachsen

waren und vor der Behandlung mit den Kulturtrypanosomen sich nicht infizieren konnten, so kann man hier mit Sicherheit die erbliche Immunität der Frösche verneinen. Es fragt sich aber weiter, warum die gleichen Impfversuche an den ganz jungen Fröschen, die auch im Aquarium des Zoologischen Institutes gezogen wurden und eben die Metamorphose beendet hatten, mißlangen? Die Kulturtrypanosomen sind nämlich in den jungen Fröschen nicht wieder gefunden worden, obwohl das entnommene Blut denen die Kulturtrypanosomen in vitro nicht zur Auflösung zu bringen vermochten.

Es ist schwer die Ursache davon festzustellen, da ich zu wenig junge Frösche gehabt habe. Aber da die zahlreichen Versuche von LEBEDEFF die nämlichen negativen Resultate zeigten, so kann man hier zwei Möglichkeiten erwähnen, welche die mißlungenen Versuche bedingt haben könnten: Entweder wurden die Trypanosomen durch den stärkeren mechanischen Druck des Blutstromes des größer gewordenen Tieres abgetötet oder die Frösche haben mit dem Eintausch der Pflanzennahrung gegen die tierische eine größere Widerstandsfähigkeit im ganzen Organismus gewonnen. Solange die Frösche im Wasser in der Zeit ihrer Metamorphose sich hauptsächlich von Pflanzen nähren, ist die Widerstandsfähigkeit der Tiere so gering, daß die Parasiten durch die natürlichen Schutzstoffe des Froschkörpers nicht vernichtet werden. Mit dem Übergang zum Landleben und zur tierischen Nahrung produziert der gesamte Froschkörper so viel Schutzstoffe, daß hier die Infektion mit allen anderen Parasiten ebenfalls erschwert sein muß. Nach dieser Auffassung ist es klar, daß die Trypanosomeninfektion der Frösche nur in der Zeit ihrer Metamorphose geschehen kann. Man kann mit Sicherheit auch nicht sagen, ob die Trypanosomen virulente Stoffe produzieren können, die für das Wirtstier pathogen wären. Wenn auch LEBEDEFF eine Erkrankung der Frösche und ferner die Möglichkeit von Trypanosomenepidemien unter Kaulquappen und Fröschen vermutet, so ist ihm weder der Nachweis einer Giftwirkung auf die Frösche noch der einer starken Vermehrung der Trypanosomen in ihnen gelungen. Bei der künstlichen Infektion der Kaulquappen aber konnte man keine krankhaften Erscheinungen an den Fröschen bemerken. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß die Kaulquappen in ihrem Körper irgendwelche Schutzstoffe haben müssen, welche auf die Kulturtrypanosomen hemmend einwirken, da die geimpften Trypanosomen sofort mit den Teilungen aufgehört haben, sobald sie in dem Kaulquappenkörper hereinkamen. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die natürlichen Schutzstoffe zwar in geringen Mengen, aber doch in Tieren vorhanden sind, die allmählich als spezifische Antitrypanosomenstoffe sich weiter entwickeln können. Wenn also die Trypanosomeninfektion auf einem frühen Stadium, wo noch wenige von den natürlichen Schutzstoffen vorhanden sind, geschah, so fangen die Kulturtrypanosomen an, sich an die neuen Lebensbedingungen des Wirtskörpers und auch an die Körper anzupassen, womit auch die Gestaltsänderung der Parasiten eng verknüpft ist. Die Tiere werden allmählich größer, bilden die undulierende Membran aus und gelangen mit dem strömenden Blut in

die verschiedenen Organe des Wirtes, wo sie eventuell auch Teilungen durchmachen können. Der Wirtskörper schützt sich aber mit seinen Antistoffen insofern, als er die Teilung der Parasiten unterdrückt und auf diese Weise die Trypanosomenvermehrung von seinem Körper fernhält; die Trypanosomen werden ihrerseits aber auch gegen den Wirt allmählich widerstandsfähiger. So erreichen die Trypanosomen und Wirtstiere gegenseitig einen gewissen Gleichgewichtszustand, ein gewisses Spannungsverhältnis, in dem die beiden Tierarten miteinander — jede dem anderen unschädlich — leben können. Wenn man aber diesen labilen Zustand stört, indem man für das Wirtstier die Existenzbedingungen verschlechtert, so fangen die Trypanosomen gleich an sich zu teilen und zu vermehren. Wenn man z. B. die Frösche längere Zeit in einem Aquarium bei 32° C hält, bis die



Textfig. J.

Tiere durch die hohe Temperatur und Hunger geschwächt und dem Tode nahe sind, findet man im Blute viele längliche Trypanosomen (Textfig. J) wie sie sonst gewöhnlich nur in der Niere mancher infizierter Frösche gesehen werden. Die Versuche des Physiologen GAULE zeigen noch prägnanter, wie mit der Abschwächung des Wirtskörpers eine Vermehrung der Trypanosomen stattfindet. Er sagt: „Da ich einem Frosche mehrere Male Blut aus der Bauchvene entnommen hatte, war derselbe allmählich sehr blutleer geworden. Ich bemerkte, daß die Trypanosomen in seinem Blute in gleichem Maße häufiger geworden waren,

als das Blut sich verdünnter gezeigt hatte. Wenn man einem Frosche das Rückenmark hinter dem Trommelfell durchschneidet, dann die Tiere 2—3 Tage in eine feuchten Wanne im Zimmer aufbewahrt, so findet man in ihrem Blute die Zahl der Trypanosomen außerordentlich vermehrt.“ GAULE hat also die Vermehrung der Trypanosomen mit zunehmender Blutverdünnung festgestellt und somit ein Resultat erhalten, das ebenso wie meine Hunger- und Temperaturversuche, die Abschwächung der Immunität und Aufhebung des Gleichgewichtszustandes zur Ursache hat. In der Natur sind diese extremen Zustände so selten, daß sie für die Verbreitung der Trypanosomen und für deren Vermehrung keine Bedeutung haben. Die Verbreitung und Übertragung der Trypanosomen kann auf diese Weise nicht in der Natur vor sich gehen, sondern wie es bei allen Blutparasiten ist, müssen die Tiere von einem Zwischenwirte wieder

zu dem Wirte herübertransportiert werden. Bei den Fischtrypanosomen sind schon mehrere Zwischenwirte beschrieben worden. Bei den Fröschen aber haben wir mit Sicherheit nur die kleine *Hirudo*-Art, die FRANÇA bei den Fröschen gesehen und als *Helobdella algira* auch beschrieben hat. In den Darmwindungen des Wurms wurden von FRANÇA kleine chritidienförmige Individuen gesehen, welche die gleiche Form hatten, wie die „kleinen echten Trypanosomen“ der von mir auf Menschenblut gezüchteten Kulturen. Außerdem sind diese Trypanosomen von *Helobdella algira* noch den langen Trypanosomentypen ähnlich, die man bei den Kaulquappen nach der künstlichen Infektion mit den Kulturtrypanosomen findet. Wenn wir diese Befunde von FRANÇA mit den unseren vergleichend zusammenfassen, so können wir folgendes sagen: Da man bei allen Untersuchungen der Kulturtrypanosomen und auch bei den vegetativen Froschtrypanosomen keine geschlechtliche Differenzierung feststellen konnte, so muß die Vermehrung der Trypanosomen auf einem anderen Wege gesucht werden. Die Tiere müssen für ihre Teilung und Vermehrung von der Spannung der tierischen Immunstoffe befreit werden und dann geht der Entwicklungskreis vermutlich ganz einfach vor sich. Aus dem infizierten Froschblute werden die Parasiten von der oben beschriebenen *Hirudo*-Art aufgenommen, in dessen Körper die Tiere ihre schnelle Teilung nach dem Vorbilde unserer Kulturtrypanosomen durchmachen. Nachdem die Teilung einige Zeit gedauert hat und die Trypanosomen eine reiche Vermehrung erfahren haben, werden sie von dem Zwischenwirte in die Kaulquappen zurücktransplantiert. In den Kaulquappen hört die Teilung auf und nun beginnt die Zeit der Anpassung, zugleich auch die Ruheperiode und die Gestaltsänderung der Trypanosomen. Das geht ziemlich langsam vor sich und der Froschkörper, dem die kleinen flagellatenähnlichen Trypanosomen keinen wesentlichen Schaden bereiten, reagiert auch nicht spontan so, daß er sofort reichliche Mengen von dem Immunstoffe produziert. Das kann man daran sehen, daß das Kaulquappenblut nach seiner Infektion die Kulturtrypanosomen *in vitro* nicht aufzulösen vermag, weder nach 14, 20 und 30 Tagen kann man die Auflösung der Trypanosomen durch das infizierte Kaulquappenblut feststellen. Wenn man dagegen kleine Frösche nimmt, in deren Blute man die großen vegetativen Trypanosomen gefunden hat, so geht die Auflösung der Trypanosomen schnell vor sich. Darauf gestützt kann man folgendes sagen: Die großen Froschtrypanosomen sind als ein Produkt des Anpassungsvermögens der Tiere hervorgegangen. Nur durch die Ausbildung der Immun-

stoffe in dem Wirtstiere können die Parasiten sich so verändern und in der Gestalt eine Ruheperiode durchmachen. Wenn man aber die Trypanosomen von der Spannkraft der Immunstoffe befreit, sei es im Zwischwirt oder auf dem künstlichen Nährboden, so werden die großen Formen in die kleinen kulturtrypanosomenartigen Formen umgebildet. Da aber die Kulturtrypanosomen ihren Widerstand der Spannungsverhältnisse eingeübt haben, so werden sie durch das infizierte Froschblut durch die vorhandenen spezifischen Stoffe, beim Zusammenmischen sofort abgetötet und aufgelöst. Es bleibt noch die Frage übrig, warum die vegetativen Froschtrypanosomen die verschiedenen Gestalten in dem Froschkörper annehmen? Aber, wie ich oben die große Anpassungsfähigkeit der Parasiten betont habe, ist es auch möglich, daß die Trypanosomen in den großen Blutbahnen, in den Capillaren, in den Organen wie Lunge, Milz und Niere verschiedene Lebensbedingungen finden und durch die Veränderung der Gestalt sich den Lebensbedingungen einfügen. Da die Frösche den Parasiten fast immer das gleiche Medium darbieten, so ist es auch begreiflich, warum man beinahe die gleichen Trypanosomenformen bei unseren Fröschen findet. Wie aber die Trypanosomen von dem Medium abhängig sind, habe ich mit meinen Wärme- und Hungerexperimenten genügend gezeigt und es folgt daraus noch, daß die Trypanosomen in den verschiedenen Gegenden, wo die Frösche unter verschiedenen Lebensbedingungen leben, auch andere Formen annehmen können. Wenn man die früher erschienenen Arbeiten über *Trypanosoma rotatorium* vergleicht, so sieht man, daß LEBEDEFF, ATHIAS und FRANÇA und MACHADO die abweichendsten Gestalten hervorheben. Es wäre noch eine weitere Aufgabe gewesen, diese Frage weiter zu berücksichtigen, wenn man das Vergleichsmaterial vor sich gehabt hätte.

Ergebnisse.

Die Trypanosomen von *Rana esculenta* und *Rana temporaria* gehören alle einer Art an. Durch die Immunstoffe der Frösche und durch die Anpassungsfähigkeit der Parasiten haben sie verschiedene Formen in den verschiedenen Organen und Blutbahnen des Wirtes ausgebildet.

Wenn die großen vegetativen Formen aus dem Wirkungsbereich der Immunstoffe herausgeraten, so beginnen die Tiere sich gleich zu teilen und nehmen kleine chritidienförmige Flagellatengestalt an.

Geschlechtliche Differenzierung ist weder bei den großen vegetativen noch bei den kleinen Kulturformen konstatiert worden.

Die Trypanosomen können sich in dem Froschkörper nur dann vermehren, wenn die Immunität der Frösche abgeschwächt ist, was durch höhere Temperaturen oder durch Erkrankung und Hunger der Frösche bewirkt werden kann.

Das infizierte Froschblut hat das Vermögen, diejenigen Trypanosomen zu töten und aufzulösen, die aus der Spannung der Immunstoffe befreit, sich einige Zeit außerhalb des Wirtskörpers auf den künstlichen Nährböden entwickelt haben.

Das inaktivierte Froschblut, das $\frac{1}{2}$ Stunde bei 60° C gehalten worden war, verliert seine schützenden Immunstoffe. Durch Zusatz vom frischen Meerschweinchenserum wird das inaktiv gemachte Froschblut wieder reaktiviert.

Die Immunstoffe der Frösche gehören zu der Gruppe der Amboceptoren, die bei den Kalt- und Warmblütern identisch sein müssen.

Die Entwicklung der Trypanosomen macht einen einfachen Cyklus durch. Von den infizierten Fröschen gelangen die Trypanosomen in den Zwischenwirt, wo sie sich durch rasche ungeschlechtliche Teilungen schnell vermehren und dann in der Zeit der Froschmetamorphose in die Kaulquappen gelangen. In den Kaulquappen hört die Teilung auf und die Trypanosomen passen sich durch die charakteristische Gestaltsänderung dem Wirte an.

Die Übertragung der Trypanosomen besorgt eine Hirudineenart, welche von FRANÇA als *Helobdella algira* beschrieben wurde.

Literaturverzeichnis.

- BOUET: Cultures des Trypanosomes de la grenouille. Ann. de l'Inst. Pasteur T. 20 1906.
- BRODEN: Les Trypanosomes des Grenouilles. Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. Bd. 9 1905.
- CHATTOU et LEGER: Sur l'autonomie spécifique du Tryp. drosophilae. Compt. rend. des seances. d. l. soc. de Biol. LXX, LXXI.
- DOFLEIN: Studien zur Naturgeschichte der Protozoen, VI. Arch. f. Protistenk. 1910 Bd. XIX p. 207.
- Biologische Untersuchungen an Trypanosomen nebst einer Färbungsmethode. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morph. u. Phys. München 1911.
- Lehrbuch der Protozoenkunde.
- DELANOE: L'importance de la Phagocytose dans l'immunité de la souris. Paris 1911. L'Inst. Pasteur.

- L. FRANÇA: Le cycle évolutif des Trypanosomes de la grenouille. Arch. de Real. Inst. Bact. Camara Pestana Bd. II 1908.
- FRANÇA et ATHIAS: Recherches sur les Trypanosomes des Amphibiens. Arch. de l'Inst. Royal de Bact. Camara Pestana Bd. I 1906.
- GONDER und SIEBER: Experimentelle Untersuchungen über Trypanosomen. Centralbl. f. Bakt., Paras. u. Inf. Bd. XLIX 1909.
- GRUBY: Trypanosomes sanguinis. Ann. Sec. Nat. Ser. 1844 Vol. I p. 105.
- GAULE: Beobachtungen der farblosen Elemente des Froschblutes. Arch. f. Anat. u. Phys. 1880.
- GOLODETZ und P. UNNA: Zur Chemie der Haut. Monatsh. f. prakt. Dermatol. 1911.
- HARTMANN: Über die willkürliche Hervorrufung von Rezidiven bei Protozoen durch künstliche Parthenogenese. Folia serol. Bd. VIII 1911 Heft 6.
- HARTMANN und PROWAZEK: Blepharoplast, Caryosom und Centr. Arch. f. Protistenk. 1907 p. 306.
- KOCH: Schlußberichte über die Tätigkeit der deutschen Expedition zur Erforschung der Schlafkrankheit. Deutsche med. Wochenschr. 46 1907.
- KÜHN und SCHUCKMANN: Über den Bau und die Teilungserscheinungen von Tryp. Brucei. Sitz.-Ber. Heidelberg Ak. Wiss. Math. nat. Kl. 1911 Abh. 11.
— — Cytologische Studien an Trypanosomen. Zool. Jahrb. XV 2. Bd. 1912 p. 330.
- KOLLE und HETSCH: Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankh. Berlin 1911.
- KEYSSELITZ: Generations- und Wirtswechsel von Trypanosomen. Arch. f. Protistenk. Vol. 7 1906.
- KAWAMURA RINYA: Die Cholesterinester-Verfettung. Verlag Fischer 1911.
- LEBEDEFF: Über Trypanosoma rotatorium GRUBY. Festschr. z. 60. Geburtstag R. HERTWIG Bd. I p. 399.
- LAVERAN et MESNIL: Trypanosomes et Trypanosomiasis. Paris 1904.
- MACHADO ASTROGILDO: Cytologische Untersuchungen über Trypanosoma rotatorium GRUBY 1911. Memor. Inst. Oswaldo Aug., Rio de Janeiro.
- MAYER: Amoeba rotatorium. Ang. Fr. Jos. K. Specilegium observatorium anat. de organo electrico et de haematozois. Bonn 1843.
- MAYER MARTIN: Pathogene Trypanosomen. Handb. d. path. Protoz. von PROWAZEK. 3. Liefer. Leipzig 1912.
- MAYER und NOCHT: Trypanosomen als Krankheitserreger. KOLLER und WASSERMANN, Handb. d. path. Mikroorg. I. Erg. B. H. 2 1906.
- MEYER ARTHUR: Die Zelle der Bakterien. Jena, Verlag Fischer, 1912.
- METSCHNIKOFF: Immunität bei Infektionskrankheiten. Jena 1902.
- NEAL und NOVY: Cultivation of Trypanosoma Lewisi. Contribut. to med. Research. 1903 1904.
- PROWAZEK: Die Entwicklung von Herpetomonas. Arb. a. Kaiserl. Gesundheitsamt XX 1904.
— Studien über Säugetiertrypanosomen. Arb. a. Kaiserl. Gesundheitsamt Vol. 22, 1905 p. 351.
— Kritische Bemerkungen zum Trypanosomenproblem. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. N. 10 1909.
- ROSENBUSCH: Trypanosomenstudien. Arch. f. Protistenk. Vol. 15 1909 H. 3.
- ROBERTSON MURIEL: Transmission of flagellates living in the blood of certain fresh-water fishes. Philos. transactions of the Royal soc. of London Series B Vol. 202.

- SCHAUDINN: Generation und Wirtswechsel bei Tryp. u. Spiroch. Arb. a. Kaiserl. Gesundheitsamt 1904.
- SCHILLING: Das Vorkommen von Autogamie bei Trypanosoma Lewis. Arch. f. Protistenk. Vol. 19 1910.
- WENDELSTADT und FÄLLMER: Einwirkung von Kaltblüterspassagen auf Nagana- und Lewisitrypanosomen. Zeitschr. f. Immunität und exper. Ther. 1909.
- WERBITZKY: Über blepharoplastlose Trypanosomen. Centralbl. f. Bakt. Abt. I Orig. 1909.
- WALKER: Trypanoplasma Ranae N. Sp. and its life Cycle in Cultures. The Journ. of Med. Research. Vol. XXIII.

Tafelerklärung.

Tafel 16.

- Fig. 1—2. Kern und Blepharoplast der jungen Kulturtrypanosomen.
- Fig. 3—5. Teilung des Kernes vor der Teilung des Blepharoplasten.
- Fig. 6—8. Zwei Blepharoplasten neben einem Kern.
- Fig. 9—10. Die Teilung des Kernes ist in der Querachse vor sich gegangen, während der Blepharoplast sich in der Längsachse gespalten hat.
- Fig. 11—12. Die Teilung des Kernes ist in der Längs- und des Blepharoplasten in der Querachse erfolgt.
- Fig. 13—15. Teilung des Kernes und des Blepharoplasten in der gleichen Richtung geführt.
- Fig. 16—17. Kernketten.
- Fig. 18. Rosettenbildung.
- Fig. 19—20. Das Verhalten des Blepharoplasten zum Kern.
- Fig. 21—22. Teilung des Centriols vor der Teilung des Caryosoms.
- Fig. 23. Mitotische Teilung des Kernes und des Blepharoplasten.
- Fig. 24. Teilung des Centriols außerhalb des Caryosoms.
- Fig. 25—26. Gleichmäßige Verteilung der chromatischen Substanz des Caryosoms im Kern.
- Fig. 27—28. Verteilung der Chromatinkörnchen an den Rändern des Kernes.
- Fig. 29—30. Vielkernige Individuen aus Hungerkulturen.
- Fig. 31—32. Chritidienförmige Individuen.
- Fig. 33—34. Herpetomonasähnliche.
- Fig. 35. Runde und birnförmige.
- Fig. 36—37. Echte kleine Trypanosomen des Menschenblutnährbodens.
- Fig. 38—40. Echte große Trypanosomen der Ziegenblutkultur.

Tafel 17.

- Fig. 41—42. Froschtrypanosomen aus der Niere mit Giemsa gefärbt, heiß mit SCHAUDINN'scher Lösung fixiert.
- Fig. 43. Die gleichen Nierenformen lebend mit Methylenblau im hängenden Tropfen gefärbt.

Fig. 44. Eine Trypanosomenform aus der Harnblase des Frosches lebend mit Methylenblau gefärbt.

Fig. 45. Fettkörnchen des großen vegetativen Froschtrypanosoms mit Sudan III lebend im hängenden Tropfen gefärbt.

Fig. 46—49. Fetttropfen der Kulturtrypanosomen mit Sudan III lebend gefärbt.

Fig. 50—51. Kleine Trypanosomenformen nach der Behandlung mit Bouillon in dem Wirtstiere.

Fig. 52—53. Große Trypanosomenformen weisen eine Dehnung der Breite nach, nach der Behandlung mit Bouillon, und nehmen nach 24 Stunden die frühere Gestalt wieder an.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

(Aus dem Pathologischen Laboratorium zu Medan [Deli, Sumatra].
Vorstand Dr. W. A. Kuenen.)

Zur Kenntnis der Sporenbildung bei den Bakterien.

Von

Dr. N. H. Swellengrebel.

(Hierzu Tafel 18.)

I. Einleitung.

In Milzausstrichen eines an Piroplasmose verstorbenen Rindes, welche in Alkohol fixiert und mit dem GIEMSA'schen Gemisch gefärbt wurden, fand ich viele sporenbildende Bakterien von stattlicher Größe, die sich zum Studium der feineren cytologischen Vorgänge bei der Sporenbildung als sehr geeignet erwiesen. Es konnte das Bakterium nicht gezüchtet werden, so daß ich mich über die eventuelle Angehörigkeit desselben zu schon bekannten Arten nicht aussprechen kann. Vorläufig werde ich es mit dem Namen „*Bacterium deliense*“ belegen.

Man findet bei den in der Literatur zerstreuten Angaben über die Sporenbildung der Bakterien mancherlei Kontroversen. Ich bin jetzt nicht in der Lage, diese Literatur in extenso zu besprechen; die vollständigen Darstellungen von MÜHLSCHLEGEL (1909), PREISZ (1904) und AMBROZ (1909) machen eine solche Besprechung auch überflüssig. Ich werde hier nur kurzgefaßt die herrschenden Ansichten der neueren Forscher referieren:

1. Die Spore wird gebildet durch eine Ansammlung des Chromatins, das im Bakterienleibe enthalten war; ein Teil des Chromatins

findet dabei nur Verwendung (SCHAUDINN 1902; DOBELL 1908, 1911; GUILLIERMOND 1908).

2. Die Spore wird aus zwei Komponenten aufgebaut: a) einer polar gelegenen chromatophilen Haube, b) einem chromatophilen Korn (der Kern), welches in die Haube eingeschachtelt wird. Die beiden Komponenten verschmelzen nachher vollkommen (PREISZ 1904). Fast völlig in Übereinstimmung damit ist NAKANISHIS (1901) Darstellung, wo aber die Haube durch eine unscharf begrenzte protoplasmatische Masse vertreten wird; A. MEYER'S (1897—1899) Beschreibung, wo die Haube zur Hohlkugel (Sporenvacuole) wird; MÜHLSCHLEGEL'S Beobachtung (1900), wo der Kern oder chromatisches Korn in einer Grundsubstanz eingelagert ist, gebildet von einer Mischung des Protoplasmas und chromophiler Körner. Bei A. FISCHER (1897) wird fast der ganze Inhalt des Stäbchens zur Spore, im Innern desselben findet man wiederum ein Chromatinkorn. Auch AMBROZ' Angaben passen in diese Kategorie (1909), da auch bei dem von ihm untersuchten *Bac. nitri* eine alveolar gebaute Grundsubstanz mit eingestreuten Chromatingranula zur Sporenanlage wird, welche beide Komponenten auch hier wieder innig vermischt werden, so daß die Granula völlig verschwinden und zuletzt eine nicht färbbare „Plastinspore“ (RŮŽIČKA 1909) entsteht. Wenn man von der theoretischen Deutung absehend nur die Tatsachen betrachtet, kann man feststellen, daß die meisten Autoren bei der Sporenbildung das Zusammenstreuen von Chromatin und einer anderen chromatophilen Substanz angeben; nur DOBELL und GUILLIERMOND lassen die Sporenanlage aus reinem Chromatin entstehen (bei DOBELL wird diese Anlage sodann von einer sich mit GIEMSA'Scher Lösung blau färbenden Wand umgeben). Bei SCHAUDINN'S Zeichnungen ist es klar, daß an der Sporenbildung, neben dem Chromatin, eine alveolar gebaute plasmatische Substanz teilnimmt, mit welchem sich das Chromatin nachher innig vermischt; es gehören folglich SCHAUDINN'S Angaben eigentlich zu der zweiten Kategorie.

II. Beschreibung des *Bacterium deliense*.

1. Vegetative Stadien.

Die vegetativen Stadien des *B. deliense* zeigen die für die Bakterien eigentümliche innere Struktur: Ein bald homogenes (Fig. 1, 3, 4, 6, 7), bald wabig gebautes Protoplasma, das mit der Giemsa-färbung einen graublauen Ton annimmt. In demselben ist das

Chromatin in der Form von Granula und Querbändern eingelagert (Fig. 4, 7), welche sich öfters zu bandartigen Gebilden vereinigen, welche sich als kurze Querbänder (Fig. 5), Zickzackbänder (Fig. 2, 3, 6, 1 b) oder netzartige Gebilde (Fig. 1 a) vom Protoplasma abheben.

Es sind dies Strukturbilder des Chromatins, wie ich sie schon bei vielen Bakterien und bei *Spirochaeta balbianii* beschrieben habe (cf. meine zusammenfassende Darstellung, 1912), deren Existenz anfänglich aufs schärfste verneint wurde, jetzt aber wohl allgemein anerkannt wird (z. B. die neueste Arbeit PETSCHENKO'S 1913).

Neben diesen Gebilden findet man auch Stadien, deren Inhalt violett gefärbt ist und keine innere Differenzierung erkennen läßt. Diese Stadien sind in Analogie zu den Befunden GUILLIERMOND'S und AMBROZ' als junge Zellen zu deuten.

2. Die Sporenbildung.

War das Chromatin in den vegetativen Stadien, noch teilweise diffus durch das Protoplasma verteilt, so ist dies zu Anfang der Sporenbildung nicht mehr der Fall, man findet jetzt nur noch chromatische Zentralstäbe und Zickzackbänder (Fig. 8—16).

Das erste Stadium der Sporenbildung ist charakterisiert durch die Ausbildung einer kompakten, nach GIEMSA sich dunkelbau färbenden, polar gelegenen cyanophilen Substanz, welche sich vom Cytoplasma durch die intensivere Färbung scharf abhebt und das eine Ende des Chromatinbandes einhüllt (Fig. 8—11), oder auch wohl von dem letzteren schleifenartig umlagert wird (Fig. 12—14). Bisweilen wird dadurch die cyanophile Substanz ganz (Fig. 15) oder teilweise verdeckt, so daß man den Eindruck gewinnt, als ob das Chromatinband einfach eine terminale Anschwellung zeigte. Es trennt sich nun das der cyanophilen Substanz auf- oder eingelagerte Chromatin vom chromatischen Bande ab und die Sporenanlage hat sich ausgebildet (Fig. 17, 18.) Im nächstfolgenden Stadium wird nun zwischen Cytoplasma und Sporenanlage eine achromatische Zone ausgebildet (Fig. 19—22), welche nach und nach die ganze Sporenanlage umgibt (Fig. 23—25). Es ist somit eine Trennung ausgebildet zwischen dem im Bakterienleibe zurückbleibenden (vegetativen) Chromatin und Plasma und dem in der Spore enthaltenen (generativen) Chromatin und Plasma. Das vegetative Chromatin wird bei der Ausbildung der achromatischen Zone zurückgedrängt; dabei sammelt es sich bisweilen gegen diese Zone an (Fig. 20a, 29a, 31a), wobei dann der Eindruck erweckt wird, als ob die Sporenanlage

von einem diaphragmatischen Gebilde vom Cytoplasma abgetrennt würde. Anfänglich hebt die chromatische Substanz in der Sporenanlage sich noch scharf von der cyanophilen Substanz ab in der Form von Granula (Fig. 18, 20, 21), Quer- resp. Längsbändern (Fig. 22 bis 25) oder Zickzackbändern (Fig. 19). Nachher wird der Inhalt der Sporenanlage homogen, es tritt eine innige Mischung der chromatischen und cyanophilen Substanz ein und die Sporenanlage wird violett gefärbt (Fig. 26, 30—32).

Die achromatische Zone wird zur äußeren Sporenwand; nächst dem Sporeninhalt findet man ein dünnes, nach GIEMSA sich rot färbendes Häutchen (Fig. 26, 31, 32). Es ist dieses das Stadium der Prospore. Die eigentliche Spore wird aus der Prospore gebildet, wodurch der Sporeninhalt unfärbbar wird; ob dieses durch die Impermeabilität der Sporenwand, oder die Unfähigkeit zur Tinktion des Sporeninhalts bedingt wird, mag dahin gestellt bleiben. Während der definitiven Ausbildung der Spore kontrahiert sich das vegetative Chromatin immer mehr (Fig. 26, 27, 32), wobei Chromatinansammlungen entstehen, die Kernen äußerst ähnlich sind (Fig. 26, 28), aber doch nicht als authentische Kerne aufzufassen sind.

Im allgemeinen sind die sporentragenden Stäbchen kurz (4,9—5,4 μ); nicht selten findet man sie aber länger (Fig. 28) und bisweilen beobachtet man eine Sporenanlage an den beiden Enden des Stäbchens (Fig. 29). Die weitere Entwicklung der beiden Sporen braucht nicht synchronisch zu verlaufen, wie Fig. 30 lehrt, wo die eine Spore schon an das Stadium der Prospore gelangte, während die andere erst als Sporenanlage da ist. Zuletzt werden aber doch richtige zweisporige Stäbchen ausgebildet (Fig. 31), die durch verspätete Teilung zuletzt noch in zwei einsporige Stäbchen zerfallen können (Fig. 32). Es haben die Bilder der Figuren 29—31 viel Ähnlichkeit mit den von SCHAUDINN (1902) beschriebenen Stadien der Autogamie von *Bacillus bütschlii* und mit der Pseudoautogamie von DOBELLE'S (1909) *Bacillus flexilis*. Diese zwei Bakterien bilden mit dem *Bacterium deliense* eine interessante Serie. Bei *Bac. bütschlii* hat man vor der Sporenbildung eine echte Plasmogamie: das Stäbchen teilt sich, die Querwand wird aber gelöst und nachher tritt eine Mischung des Plasmas der beiden Hälften durch Strömung ein; dann werden die Sporen gebildet. Bei *Bac. flexilis* wird die Plasmaströmung nicht mehr beobachtet, bei *Bact. deliense* bleibt auch die Querwandbildung aus, so daß in dem letzteren Fall von einem geschlechtlichen Prozeß nicht mehr die Rede sein kann.

III. Zusammenfassung und Deutung.

Bei der Sporenbildung von *Bact. deliense* treten eine chromatische und cyanophile Substanz in Zusammenwirkung. Dieses ist in Übereinstimmung mit den Befunden vieler Autoren, aber in Gegensatz mit der Auffassung, daß die Spore nur aus dem Chromatin entstehen soll. Es wird bei der Sporenbildung nur ein Teil des Chromatins und des Protoplasmas verbraucht, das übrige geht mit dem Rest des Stäbchens zugrunde. Es ist also die Sporenbildung eine innige Vereinigung zweier im Bakterienleibe präformierten, sich färberisch unterscheidenden Substanzen.

Das vegetative Leben des Bakteriums ist gerade das Gegenteil:

Hier, wie bei vielen anderen sporenbildenden Bakterien (cf. GUILLIERMOND 1908; AMBROZ 1909), ist in dem jungen Stäbchen eine Trennung der chromatischen und plasmatischen Substanzen nicht vorhanden oder doch nur angedeutet. Im Verlauf des vegetativen Lebens wird die Differenzierung immer deutlicher, um kurz vor der Sporenausbildung ihren Höhepunkt zu erreichen. Die Zusammenballung des Chromatins in den sporentragenden Stäbchen, wobei kernartige Gebilde entstehen, betrachte ich als eine degenerative Übertreibung dieses Differenzierungsprozesses.

Es gestaltet sich folglich die Sporenbildung als ein Regulierungsvorgang, welcher der extremen Differenzierung des Bakterienleibes entgegenwirkt. Warum dergleichen Vorgänge sich nur bei einem Teile der Bakterien (den Sporenbildnern) vorfinden und inwiefern sie bei den übrigen Bakterien durch andere Prozesse ersetzt werden können, muß vorderhand unentschieden bleiben.

* * *

In seinem lichtvollen Vortrag in der Sitzung der Deutschen zoologischen Gesellschaft hat bekanntlich SCHAUDINN (1905) die Ansicht ausgesprochen, die Befruchtung bezwecke den Ausgleich der während des vegetativen Lebens immer schärfer sich ausbildenden Differenzierung der vegetativen (weiblichen) und animalischen (männlichen) Elemente. Diese Differenzierung, die er an *Trypanosoma noctuae* beobachtete, bezieht sich da auf verschiedene einzellige Individuen und zumal auf die Kerne dieser Individuen. Die Befruchtungsvorgänge im Innern einer einzigen Zelle (Autogamie; cf. HARTMANN 1909) lehren aber, daß die These SCHAUDINN's, die als Leitprinzip aller Befruchtungsvorgänge aufgestellt

wurde, auch hier geltend zu machen ist. Ganz allgemein genommen gestaltet sich der Befruchtungsvorgang als eine Entdifferenzierung durch Verschmelzung der Repräsentanten der vorwiegend animalischen und vorwiegend vegetativen Funktionen. Schon SCHAUDINN hat seine Auffassung verallgemeinert, indem er sich den zur Befruchtung Anlaß gebenden Dualismus in der Zelle nicht nur als einen Kerndimorphismus dachte, sondern auch als einen Dimorphismus der Gesamtorganisation.

Während des vegetativen Lebens kommt ein Dualismus auch bei vielen der Bakterien zum Ausdruck in dem immer schärfer sich ausprägenden Unterschied zwischen chromatischen und plasmatischen Substanzen.

Ist dieser Dualismus aber mit jenem von SCHAUDINN gemeinten zu vergleichen, d. h. liegen diesen beiden Elementen auch verschiedene Funktionen ob, dem einen die animalische (formgebende, teilungserregende, lokomotorische), dem anderen die vegetative (trophische) Funktion? Von SCHAUDINN (1902), GUILLIERMOND (1908) und von mir (1909) wurde auf die Bedeutung der chromatischen Substanz für die Bildung der Querwände hingewiesen. Bei *Sphaerotilus natans* kann sogar beobachtet werden, daß die querwandbildenden Chromatinmassen zu Anfang noch mit dem chromatischen Zentralkörper zusammenhängen. Bei jenen Bakterien, wo das Chromatin in der Form eines Zentralstabes, chromatischen Zentralkörpers oder kernartigen Anhäufung vorhanden ist, wird die Zellteilung durch die Teilung dieser chromatischen Gebilde eingeleitet. Es liegt also auf der Hand, einen gewissen Einfluß der chromatischen Substanz des Bakterienleibes auf die Zellteilung anzunehmen. Die Form des Bakteriums wird zumal von der äußeren Hülle bedingt, welche, wenigstens was die Querwände anbelangt, sicher vom Chromatin gebildet wird. Für die Längswände ist dieses nicht erwiesen, die Rotfärbung derselben bei der Giemsa-Färbung könnte aber darauf hindeuten. PROWAZEK (1907) hat schon auf die mutmaßliche Funktion der chromatischen Spirale und Zentralstabes der *Spirochaeta balbianii* als formbedingendes Organell hingewiesen, dieselbe Vermutung gilt für die nämlichen Gebilde bei vielen Bakterien.

Da wo das Chromatin ganz regellos durch die Zelle zerstreut liegt, kommt diese Funktion natürlich nicht in Betracht.

Über den Einfluß des Bakterienchromatins auf die Bewegung liegen nur spärliche Beobachtungen vor; es sei aber auf die zuerst von mir (1907) verzeichneten und nachher von FUHRMANN (1910) be-

stätigten Befunde des Vorkommens von Basalkörnern bei den Geißeln von *Spirillum giganteum* (*S. volutans*) hingewiesen.

Es ist also nicht unbegründet, dem chromatischen Bestandteil der Bakterienzelle spezielle Bedeutung bei der Formbildung und Zellteilung, vielleicht auch bei der Lokomotion beizumessen.

Die Bedeutung des plasmatischen Komponenten für das vegetative Leben ist ohne weiteres deutlich: in diesem finden wir die verschiedenen Reserveprodukte der Zelle, die Vacuolen, kurz alles was sich auf die Ernährung der Zelle bezieht. Ich glaube also, daß man sich auf die verschiedenen Befunde stützend behaupten kann, daß der von SCHAUDINN postulierte Dualismus sich auch bei den Bakterien findet und daß ihre morphologische Grundlage einerseits den chromatischen, andererseits den plasmatischen Zellbestandteil darstellt. Ist dieser Schluß aber richtig, dann muß man auch die bei der Sporenbildung beobachtete Verschmelzung von Teilstücken dieser beiden Elemente als ein der Befruchtung homologes Ereignis betrachten.

Diese Anschauung, welche die Frage nach dem Vorkommen von sexuellen Erscheinungen bei den Bakterien für die Sporenbilder jedenfalls der Lösung näher bringen würde, bringt die Schwierigkeit mit sich, daß dadurch unsere Ansichten über den Bau der Bakterienzelle wesentliche Änderungen erfahren. Im allgemeinen wird ja angenommen, daß das Chromatin der Bakterienzelle mit dem Kernchromatin höher organisierter Zellen zu identifizieren sei, das Protoplasma wäre mit dem Cytoplasma + Kernplasma zu homologisieren. Bei der Sporenbildung wird aber ein Teil des Plasmas zu einer der beiden Komponenten, nämlich der vegetativen Komponente (♀ Kern), währenddem ein Teil des Chromatins dem animalen Komponenten (♂ Kern) entspricht. Es finden sich folglich die Homologa der Kernsubstanz nicht nur in dem chromatischen, sondern auch in den achromatischen Zellenbestandteilen des Bakterienleibes, was an und für sich nichts Befremdendes hat, wo wir doch auch unter den echten Kernen solchen begegnen, die sich mit GIEMSA'scher Lösung blau färben (cf. PROWAZEK 1910 p. 24). Es ist wohl auffallend, daß man bei dieser Betrachtungsweise der alten BÜTSCHLI'schen, neuerdings wieder von RŮŽIČKA (1907) vertretenen Ansicht der Kernnatur der Bakterienzelle nahe geführt wird. Es wäre m. E. aber verfehlt diese Auffassung ohne weiteres anzuerkennen, da die Homologie der chromatischen und plasmatischen Komponenten der Sporenanlage mit dem ♂ und ♀ Kern nur funktioneller, nicht morphologischer Natur ist.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die Tatsache, daß nur ein kleiner Teil des Chromatins und Plasmas bei der Sporenbildung Verwendung findet und der größte Teil dieser Substanzen zugrunde geht, wohl eine gewisse Analogie mit der Kernepuration (ich verwende hier absichtlich nicht den Terminus „Reduktion“) der Geschlechtskerne aufweist.

Wie dem auch sein mag, sicher haben die hier angeführten theoretischen Erörterungen eine genügend exakte Grundlage, um weitere Forschung in dieser Richtung aussichtsvoll erscheinen zu lassen.

Literaturverzeichnis.

- AMBROZ (1909): Entwicklungscyclus von *Bacillus nitri*. *Centralbl. f. Bakt. Abt. I* Bd. 51 p. 193.
- DOBELL (1908): Note on some parasitic protists. *Quart. Journ. Microscopy Science* Bd. 52 p. 121.
- (1909) on the so-called sexual method of spore-formation in disporic bacteria. *Eod. loc.* Bd. 53.
- (1911) Contribution to the cytology of the Bacteria. *Eod. loc.* Bd. 56.
- FISCHER (1897): Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Jena, Gustav Fischer.
- FUHRMANN (1910): Die Geißeln von *Spirillum volutans*. *Centralbl. f. Bakt. Abt. II* Bd. 25 p. 129.
- GUILLIERMOND (1908): Contribution a l'étude cytologique des bacilles endospores. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 12 p. 9.
- MEYER (1897): Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien. *Flora* Bd. 84.
- (1899): Über Geißeln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien. *Eod. loc.* Bd. 86.
- MÜHLSCHLEGEL (1900): Über die Bildung und den Bau der Bakteriensporen. *Centralbl. f. Bakt. Abt. II* Bd. 6 p. 65 u. 97.
- NAKANISHI (1901): Über den Bau der Bakterien. *Eod. loc.* Abt. I Bd. 30 p. 109.
- PETSCHENKO (1913): *Chlamydothrix ochracea*. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 28 p. 239.
- HARTMANN (1909): Autogamie bei Protisten. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 14 p. 264.
- PREISZ (1904): Studien über die Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus. *Centralbl. f. Bakt. Abt. I* Bd. 35 p. 422.
- PROWAZEK (1910): Einführung in die Physiologie der Einzelligen. Teubner, Berlin.
- (1907): Die Sexualität bei den Protozoen. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 9 p. 22.
- RČŽIČKA (1907): Depressionszustände und Regulationsvorgänge bei dem *Bact. anthracis*. *Arch. f. Protistenk.* Bd. 10 p. 247.
- (1909): Die Cytologie der sporenbildenden Bakterien und ihr Verhältnis zur Chromidienlehre. *Centralbl. f. Bakt. Abt. II* Bd. 23 p. 288

- SCHAUDINN (1902): *Bacillus Bütschlii*. Arch. f. Protistenk. Bd. 1 p. 306.
 — (1905): Die Befruchtung der Protozoen. Verh. Deutsch. Zool. Gesellsch. in Breslau p. 16.
 SWELLENGREBEL (1907): Sur la cytologie comparée des Spirochètes et des Spirilles. Ann. de l'Inst. Pasteur. Bd. 21 p. 448.
 — (1909): Untersuchungen über die Cytologie einiger Fadenbakterien. Arch. f. Hyg. Bd. 70 p. 380.
 — (1912): Trypanosomen, Spirochäten und Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 51 p. 129.

Tafelerklärung.

Tafel 18.

Fig. 1—7. Vegetative Stäbchen.

Fig. 1 a. Netzartig angeordnetes Chromatin.

Fig. 1 b, 2, 3. Chromatin in Zickzackband.

Fig. 4. Diffus verteiltes Chromatin.

Fig. 5. Chromatin als zerbrückeltes Längsband.

Fig. 6. Zickzackband.

Fig. 7. Querbänder.

Fig. 8—32. Sporenbildung.

Fig. 8—11. Das Chromatin dringt ins Innere der cyanophilen Substanz ein.

Fig. 12—16. Das Chromatin umlagert die cyanophile Substanz.

Fig. 17—18. Abtrennung der Sporenanlage vom Chromatinfaden.

Fig. 19—25. Entwicklung der achromatischen Zone um die Sporenanlage.

Fig. 26. Prospore. Chromatin und cyanophile Substanz innig vermischt.

Fig. 27. Zwei kurze sporentragende Stäbchen.

Fig. 28. Lauges sporentragendes Stäbchen.

Fig. 29. Zwei Sporenanlagen in einem Stäbchen.

Fig. 31. Zwei Prosoporen in einem Stäbchen.

Fig. 32. Verspätete Teilung eines wie in Fig. 31 abgebildeten Stäbchens.

Alle Figuren sind gezeichnet am Fuße des Mikroskops mit dem ZEISS'schen Zeichenapparat. Kompensationsokular 18, Ölimmersion $\frac{1}{12}$ (ZEISS).

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg.
Leiter: Obermedizinalrat Prof. Dr. Nocht.)

Über *Nebela collaris* EHRENBURG.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Max Klitzke.

(Hierzu Tafel 19.)

Im Juli 1912 überließ mir Dr. S. VON PROWAZEK einige Mooskulturen mit Nebelen zur Bearbeitung. Ich bin ihm sehr zu Dank verpflichtet für das Interesse, das er den Untersuchungen entgegenbrachte. Es ist mir nicht gelungen, den ganzen Entwicklungsgang der *Nebela* klarzustellen; deshalb veröffentliche ich in diesem vorläufigen Bericht nur die wichtigsten Tatsachen aus der Biologie und der Entwicklung der *Nebela*, die ausführliche Arbeit lasse ich folgen.

LEIDY¹⁾ trennte 1874 das Genus *Nebela* vom Genus *Diffugia* 1879²⁾ beschrieb er sieben Species. Die Zahl der Species ist jetzt auf ungefähr 20 gestiegen. LEIDY erkannte bereits, daß die Species *N. collaris* und *N. flabellulum* ineinander übergehen, und TARÁNEK³⁾ erwähnt von der von ihm aufgestellten Species *N. bohemica*, daß sie durch Übergänge mit *N. collaris* und *N. flabellulum* verbunden ist.⁴⁾

¹⁾ J. LEIDY: Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 1874.

²⁾ J. LEIDY: Freshwater Rhizopods of North America. Washington 1879.

³⁾ K. J. TARÁNEK: Beiträge zur Kenntnis der Süßwasser-Rhizopoden Böhmens. Sitzungsberichte der königl. böhm. Gesellschaft der Wissenschaften. Prag 1881.

⁴⁾ K. J. TARÁNEK: Monographie der Nebeliden Böhmens. Abhandl. d. königl. böhm. Gesellschaft der Wissenschaften. Prag 1882.

Erst AWERINZEW¹⁾ vereinigt die drei Formen als *N. collaris* EHRBG. spec. und unterscheidet *N. coll. var. typica*, *var. bohemica*, *var. flabellulum*. Meine Beobachtungen habe ich an *N. coll. var. bohemica* angestellt.

Nebela gehört zu den *Testacea*, ihre Pseudopodien sind walzenförmig, vorn abgerundet; die Schale besteht aus rundlichen, seltener eckigen oder stabförmigen Kieselplättchen, die sich nicht überdecken, sondern nebeneinander in die Schalenmembran eingelassen sind. *N. coll. var. boh.* unterscheidet sich von *N. coll. var. typ.* und *var. flab.* durch die Form der Mundöffnung. Bei *N. coll. var. boh.* schneidet die Mundöffnung glatt ab, während die beiden anderen Formen seitlich schwache Einschnitte in derselben aufweisen.

Die Schale der *N. coll. var. boh.* ist zweistrahlig gebaut. Die meisten Figuren zeigen sie von vorn; sie ist birnförmig, der Fundus ist bauchig erweitert, während der orale Teil verengt ist; im Querschnitt ist die Schale oval, einen Längsschnitt zeigt Fig. 8. Im oralen Teil weist die Schale seitlich je einen Porus auf. Die Poren der *N. collaris var. bohem.* sind sehr schwer zu beobachten, deshalb mögen sie den früheren Autoren entgangen sein. Von ihrer Anwesenheit kann man sich aber leicht überzeugen, wenn man einen leichten Druck auf eine *Nebela* ausübt; dann quillt sowohl aus der Mundöffnung als auch aus den seitlichen Poren Plasma hervor. Die *Nebela*-Schale ist nicht starr, sondern nachgiebig; man findet nicht selten eingedrückte Schalen. Bei sehr kräftigem Druck platzt die Schale. Die Schalen freier Tiere sind nahezu farblos; alte, leere Schalen sind gelb gefärbt. TARÁNEK gibt 1882 an, daß eine gelbliche Färbung ein unterscheidendes Merkmal der *N. boh.* sei, aber ihm lagen zur Hauptsache leere Schalen vor, und diese weisen ja auch eine gelbe Färbung auf. Nicht die ganze Schale kann sich gelblich verfärben, sondern nur ihre chitinige Schalenmembran; unter den Schalenplatten ist sie außerordentlich dünn, zwischen ihnen bildet sie Leisten, die sich wulstartig über das Niveau der Platten erheben können. Nach der Mundöffnung zu verdickt sich die Membran. In der Nähe des Mundes fehlen die Platten. Die Form und Größe der Schalenplatten variiert bei den verschiedenen Tieren außerordentlich, ja, auf einem einzigen Tier lassen sich zuweilen Zonen verschiedener Schalenbildung unterscheiden. Diese sonderbare Variabilität ließe sich nicht erklären, wenn man annähme,

¹⁾ S. AWERINZEW: Die Süßwasserrhizopoden. Lieferung 1 und 2. Travaux de la Soc. d. Natural. d. St. Pétersb. T. XXXVI Lief. 2 1906. Russisch mit deutschem Résumé.

daß alle Platten endogenen Ursprungs seien. In der Tat stammen viele Schalenplatten von außen, d. h. sind auf die Schalen von gefressenen Rhizopoden zurückzuführen; da *Euglypha* sehr häufig neben der *N. coll.* var. *boh.* vorkommt, so findet man häufig die charakteristischen, gezähnten Mundplatten, und auch die elliptischen Platten der *Euglypha* in der Schale der *N. coll.* Auch die Schalenplatten anderer *Testacea* findet man zum Bau benutzt. Ich möchte jedoch bezweifeln, daß sämtliche Platten von außen stammen, weil kleine Nebelen, wie *Neb. militaris* PENARD, keine anderen *Testacea* fressen können, und sich deshalb die Schalenplatten wohl selbst herstellen müssen. Weshalb sollte die verwandte *N. coll.* die Fähigkeit der Plattenbildung ganz verloren haben? Die Form der Platten ist der verschiedenen Herkunft gemäß sehr verschieden. Die Platten sind groß oder klein, kreisrund oder elliptisch, eckig oder stäbchenförmig (Diatomeen); sie überdecken sich nur selten. Die Länge der Schalen beträgt im Durchschnitt $110\ \mu$, die Breite $80\ \mu$. Es kommen erhebliche Abweichungen sowohl in der Länge, als in der Breite, als auch im Verhältnis von Länge und Breite vor. Diese Veränderlichkeit der Schalen bewirkt die unscharfe Abgrenzung der drei Formen gegeneinander. Ich habe zweierlei Messungen vorgenommen, ich habe August- und Dezembertiere gemessen. Im August betrug die durchschnittliche Länge $110,2\ \mu$, die Breite $80,2\ \mu$, im Dezember $109,2\ \mu$, resp. $79,8\ \mu$. Die geringe Abweichung, die sich zeigt, liegt innerhalb der Fehlergrenzen der Messungen. AWERINZEW 1906 nimmt an, daß die *Testacea* nördlich des Polarkreises, in kalten Gegenden, größer sind als dieselben Arten in der gemäßigten (wärmeren) Zone. Wenn es sich so verhielte, wäre es wahrscheinlich, daß an einem Ort die Wintertiere größer wären als die Sommertiere. Meine Messungen haben diese Folgerung nicht bestätigt.

Die Größe des Plasmakörpers schwankt außerordentlich; bald füllt das Tier die ganze Schale aus, bald nur ein Viertel derselben.

Das Tier wird umgeben von einer Niederschlagsmembran. Diese ist kein festes Strukturelement; sie ist an verschiedenen Körperstellen verschieden dick, zuweilen scheint sie ganz eingeschmolzen. In den Pseudopodien baut sie sich aus dem Ectoplasma wieder auf. In Schnitten hebt sich die Membran als dunkler Strich vom Ectoplasma ab.

Das Ectoplasma tritt nur in den Pseudopodien in stärkerer Entwicklung auf, sonst legt es sich als dünne Schicht zwischen Niederschlagsmembran und Entoplasma an und ist oft kaum dicker als die Membran. Im Leben ist das Ectoplasma glasklar, jedoch ist

es nicht homogen, sondern in ihm liegen winzige, sehr schwach lichtbrechende Körnchen. Eine wabige Struktur ist nicht vorhanden, die Körnchen sind frei beweglich.

Den feineren Bau des Entoplasmas kann man am lebenden Tier nicht wahrnehmen, so sehr ist es angefüllt mit grünen, gelben, braunen und farblosen Nahrungsbällen, mit Schalenplatten, mit Diatomeenpanzern und Schalen gefressener Rhizopoden; wenn man zufällig etwas reines Entoplasma findet, so sieht man, daß es ein wenig trüber ist als das Ectoplasma; auch in ihm befinden sich schwach lichtbrechende Granula.

Der Kern befindet sich im Fundus der Schale; im Leben sieht man ihn als schwach milchigen Fleck im Entoplasma schimmern, es gelingt, ihn durch Druck auf das Deckglas zu isolieren, weil er eine dicke, doppelt konturierte Membran besitzt. Die Struktur des isolierten Kerns weicht nicht von der des fixierten und gefärbten Kernes ab; er ist kugelig; die pralle Gestalt wird bedingt durch den klaren Kernsaft; das Chromatin tritt in Form einer größeren Zahl kleiner, vital grünlich erscheinender „Nucleoli“ auf und ist mit der Nucleolarsubstanz vermischt; die Nucleoli sind von wabigem Bau, ihre Größe und Zahl ist Schwankungen unterworfen; zuweilen findet man Kerne mit nur einem einzigen Nucleolus, doch sieht man in diesem Fall an Veränderungen von Plasma und Chromidien, daß Degenerationsstadien vorliegen. Die Nucleolen sind von einer Schicht von Alveolen umgeben, die man nur in günstigen Fällen klar wahrnehmen kann; im Leben erscheinen sie als helle Bläschen, im Präparat gehen die Alveolenwände strahlig vom Nucleolus aus. Die Nucleolen liegen in einem Netzwerk von schwach lichtbrechenden Granula.

Die sogenannten Chromidien können in sehr verschiedener Menge auftreten, bald füllen sie die ganze hintere Partie des Tieres an, bald stellen sie nur wenige Stränge in der Nähe des Kernes dar. Auch die gröbere Struktur der Chromidien schwankt sehr; sie können ganz locker sein, sie können aber auch dicht, klumpig aussehen. Im Leben sieht man in der hinteren Hälfte der Tiere stark lichtbrechende Körnchen, die Chromatingranula. Das gefärbte Präparat zeigt, daß die Chromatingranula in einer schwächer färbbaren Grundsubstanz liegen; die Grundsubstanz mit den Chromatingranula bildet ein Netzwerk aus kleineren oder größeren Maschen; die kleineren Maschen sind frei von Inhaltsgebilden, die größeren Ringe umschließen Kohlehydratkörner.

Kohlehydratkörner sind zuerst von ZUELZER¹⁾ für *Diffugia urceolata* beschrieben worden; ZUELZER stellte ihre glykogenartige Natur fest, ich habe die Reaktionen mit denselben Ergebnissen bei *Nebela* wiederholt. Spätere Autoren sprechen von Glykogenkörnern bei den *Testacea*. Aus Glykogen jedoch bestehen diese Körnchen sicher nicht, da sie in Wasser unlöslich sind. Im Leben sieht man die Kohlehydratkörnchen als grünliche Körper, sie sind ungefähr 3,5 μ groß, ihre Größe schwankt ebenso wie ihre Form; häufig sind sie kugelig, oft aber auch unregelmäßig gestaltet. Für ihre färberrische Darstellung im Dauerpräparat habe ich die Methode für Glykogenfärbung von BEST benutzt; außer Glykogen lassen sich auch andere Kohlehydrate, z. B. Zellulose, färben. Darstellung nach BEST:

Härtung der Rhizopoden in Sublimatalkohol nach SCHAUDINN.
 Vorfärbung mit Hämalaun nach P. MAYER, konz. ca. 15 Min.
 Eventuelles Differenzieren in Alaun 2 Proz.
 Auswaschen.

Färbung in der Karminlösung nach BEST ca. 5 Min.:

Karmin	2 g
Kaliumkarbonat	1 „
Kaliumchlorid	5 „
Dest. Wass.	60 „

werden einige Minuten gekocht, nach Abkühlung der Lösung werden 20 g Ammoniak hinzugefügt. Die Stammlösung hält sich im Eisschrank etwa 1 Monat. Vor Gebrauch wird filtriert. Zur Färbung gießt man

Stammlösung	2 Teile
Ammoniak	3 „
Methylalkohol	3 „

zusammen; diese Lösung ist nur kurze Zeit haltbar.

Differenzierung ca. 1 Min. in

Methylalkohol	40 ccm
Alkohol abs.	80 „
Dest. Wass.	100 „

Durchführung durch Alkohol, Xylol, in Kanadabalsam.

Die Kohlehydratkörner sind dann leuchtend rot gefärbt, Kerne und Chromidien erscheinen tiefblau, das Plasma ist schwach bläulich gefärbt; häufig sind einzelne Teile von Nahrungskörpern rot gefärbt; die rote Farbe deutet vielleicht den Aufbau der verdauten

¹⁾ M. ZUELZER: Beiträge zur Kenntnis von *Diffugia urceolata* CARTER. Arch. f. Protistenkunde 4, 1904.

Substanzen zum Kohlehydrat an; wie die geformten Körner entstehen, vermag ich nicht zu sagen; das gefärbte Tier weist sie sowohl in den Ringen der Chromidien, als auch frei im Plasma auf, sie sind von keiner Membran umgeben. Über die Verwendung der Kohlehydratkörner soll später berichtet werden.

Der Körper der *Nebela* ist mit zahlreichen Epipodien in der Schale befestigt; die Epipodien sind ectoplasmatischen Ursprungs, ihre Länge ist Schwankungen unterworfen und richtet sich nach der Größe des Plasmakörpers; sie kann ungefähr die Hälfte der Schalenlänge betragen, meistens ist sie bedeutend geringer. Die Epipodien sind außerordentlich fein, seltener etwas dicker; ihre Basis ist breit, das Entoplasma kann in sie hineinragen. Zuweilen ist die untere Hälfte dick, aus ihr können dann zwei dünne Epipodien hervorgehen. Die Epipodien sind kontraktile; ich beobachtete, wie lange Epipodien sich plötzlich verkürzten, und den Körper in den Fundus der Schale zogen, der Körper selbst zog sich auch in demselben Augenblick in sich selbst zusammen.

Die Bewegung erfolgt durch walzenförmige Pseudopodien; meistens sendet das Tier mehrere gleichzeitig aus, selten nur ein einziges. Die Dicke des Pseudopodiums schwankt, ebenso wie die Länge; die Pseudopodien können länger werden als die Schale. Aus dem körnigen Ectoplasmapfropf, der die Schalenmündung einnimmt, bricht bei der Pseudopodienbildung ein halbkugeliges, hyalines Tropfen hervor, gleich darauf strömt das körnige Ectoplasma hinein, die Körnchen führen in der Spitze des Pseudopodiums tanzende Bewegungen aus, um dann am Mantel des walzigen Pseudopodiums zur Ruhe zu kommen. Aus dem Ectoplasma strömt durch das Pseudopodium Plasma nach, dessen Körnchen dann in dem gleichmäßig vorströmenden Vorderende tanzen. Das Vorderende ist halbkugelig gestaltet. Wenn das Pseudopodium eingezogen wird, tritt vorn Ruhe ein, das Plasma strömt durch die Mitte zurück, das Pseudopodium schrumpft zusammen und wird schließlich aufgelöst. Während des Zurückziehens brechen an den Seiten kleine Pseudopodien hervor, die jedoch gleich wieder eingezogen werden. Das ausgewachsene Pseudopodium tastet im Halbkreis nach einem Anheftungspunkt umher; findet es einen solchen, so klebt seine Spitze daran fest, alle übrigen Pseudopodien lassen los, das Tier rückt gegen den Anheftungspunkt vor, wobei das festgeklebte Pseudopodium von der Basis her eingezogen wird. Wenn ein Pseudopodium sehr lang ist, kann es vorkommen, daß das Entoplasma mit in die Basis einströmt. Das Tier kriecht meistens im Detritus mit der Schalenmündung nach unten.

Liegt eine *Nebela* auf der Seite, so sendet sie Pseudopodien unter die Schale; dann zieht sich die äußere Seite derselben zusammen, und der Rhizopode richtet sich langsam auf.

Ich beobachtete einmal, wie eine *Nebela* ein kleines beschaltes Rhizopod fraß; das Tier lag in einiger Entfernung von der *Nebela*, quer zu ihrer Mundöffnung und war in seine Schale zurückgezogen. Die *Nebela* kroch gerade auf diese zu und umgriff sie mit ihren Pseudopodien; mit ihnen brachte sie das Tier in eine Lage senkrecht zur Mundöffnung, so daß das Tier hindurch konnte; hernach wurde es gleichsam eingesogen, im Anfang langsam, dann schneller; bald war es jedoch zwischen den vielen Nahrungsballen des Entoplasmas verschwunden. *Neb. coll.* frißt Tiere und Pflanzen, man findet in ihr die halbzerstörten Schalen von *Testacea*, Diatomeenschalen, kleinere Rotatorien, Kugelalgen usw.

Die unverdauten Nahrungsreste werden in Vacuolen nach der Schalenmündung getragen; wenn diese in das Ectoplasma hineintreten, erkennt man, daß sie von einer schwach rötlich erscheinenden Flüssigkeit erfüllt sind; die Vacuole wird explosionsartig entleert, die Abfallstoffe werden in das umgebende Wasser geschleudert.

Es kommen mehrere pulsierende Vacuolen vor, die zwischen den Epipodien im hinteren Teil des Tieres liegen. Im Entoplasma, dem Ectoplasma genähert, entstehen sie aus Bildungsvacuolen, ihr Durchmesser beträgt etwa die Hälfte des Kerndurchmessers; wenn sie diese Größe erreicht haben, ist die Niederschlagsmembran ausgebaucht. Die Entleerung der Vacuolen geschieht explosionsartig; einmal beobachtete ich, daß zwei Bildungsvacuolen nicht zusammenflossen, sondern ihren Inhalt einzeln, nicht ganz gleichzeitig entleerten.

In meinem Material fand ich mehrere Teilungsstadien, jedoch waren keine Kernteilungsstadien darunter; die Tiere sind am späten Nachmittag getötet worden und gehören zu einer Präparatenserie aus dem Februar; um diese Zeit sind die meisten Tiere noch encystiert. Die Tiere entledigen sich bei der Teilung nicht der Nahrungsballen; anfangs füllen sie die Schale ganz aus, später rückt der Plasmakörper nach der Schalenmündung zu, er tritt in Form eines Plasmapfropfes mit Schalenplatten aus. Mit seinem Wachstum rücken die Schalenplatten in die äußeren Teile des Pfropfes; die Chromidien liegen noch im hinteren Teil des Tieres um den Kern. Die Kernteilung scheint erst bei weit vorgeschrittener Schalenbildung einzusetzen. Außer den Februartieren habe ich noch zwei Teilungsstadien aus dem August gesehen, sie waren mit Hämatoxylin nach

BÖHMER und mit Karmin nach BEST gefärbt. Der Plasmapropf war besonders an der Oberfläche diffus rot tingiert, wo sich wahrscheinlich die Kohlehydratkörner aufgelöst haben; die Anreicherung des Kohlehydrats auf der Oberfläche deutet auf eine Verwendung desselben zum Aufbau der Schalenmembran hin; unterstützt wird diese Ansicht durch eine Beobachtung an *Euglypha*. Bei der Encystierung verschließt *Euglypha* die Schale durch eine Membran; diese, sowie das angrenzende Plasma, sind zu Beginn der Encystierung nach BEST rot färbbar; auch hier weist die Färbung darauf hin, daß die Membran aus Kohlehydrat gebildet wird. Die Bildung der Schalenmembran aus Kohlehydraten ist auch nach den Ergebnissen der Chemie gar nicht unwahrscheinlich, da sie aus einer Art von Chitin besteht. Chitin wird aber nach neueren Angaben aus Glykogen gebildet.

Seit Ende August traten in meinen Präparaten Cysten von *Nebela* auf; ZUELZER fand in ihren Kulturen von *Diffugia urceolata* bis Mitte Januar unencystierte Tiere, im Freien solche dagegen nur bis Mitte November. Kulturen von *Nebela* habe ich nur im Sommer 1912 gehalten; seitdem habe ich stets frisches Material aus einem moorigen Tümpel bei Ohlsdorf (Hamburg) untersucht; ich habe, im Gegensatz zu ZUELZER'S Beobachtungen an *D. urceolata*, im Freien während des ganzen Winters einzelne unencystierte Nebelen gefunden. Nach diesem Befunde scheint es, als ob *Nebela* nicht notwendig eine Entwicklung im Winter durchmachen müsse, aber es ist auch möglich, daß die unencystierten Nebelen diese schon hinter sich oder noch vor sich haben, denn die Tiere stehen nicht gleichzeitig in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Diese Beobachtung hat auch ZUELZER gemacht. Ich fand gleiche Stadien Ende Oktober und Ende März.

Für die meisten *Testacea* wird angegeben, daß sie vor der Encystierung ihr Plasma von aller Nahrung reinigen. Die *Nebela*-Cysten dagegen enthalten meistens Nahrungspartikel, jedoch viel weniger als freie Tiere. Häufig findet man in der Schale neben oder vor der Cyste rundliche Ballen, ausgestoßene Nahrung; diese Detritusklumpen können die Schalenmündung verstopfen; oft wird diese auch durch geschichtete Schalenplatten versperrt; zuweilen ist sie auch ganz frei. In ganz wenigen Fällen beobachtete ich, daß die Schale durch eine dünne Membran verschlossen war. Aus den verschiedenen Möglichkeiten des Schalenverschlusses und aus der Anwesenheit von Nahrung in der Cyste möchte ich schließen, daß der Encystierung keine längeren Vorbereitungen vorausgehen, sondern

daß sie durch äußere Einflüsse, vielleicht durch Kälte, hervorgerufen wird.

Vor der Encystierung enthalten die Tiere nicht mehr Kohlehydrat als im Sommer. Zur Encystierung runden sich die Tiere ab, sie verringern ihr Volumen, ihr Plasma wird stärker lichtbrechend und intensiv färbbar, an der Oberfläche scheidet sich eine dünne Cystenmembran ab; sie ist farblos, auch im Dauerpräparat weist sie keinerlei Struktur auf, selten sind ihr einzelne Schalenplatten angelagert.

Der Kern geht während der Entwicklung zugrunde; er gibt kein Chromatin ab, wie es von ZUELZER für *Diffugia urceolata* beschrieben wird. Im Anfang ist der Kern noch normal, und zahlreiche, vakuolisierte Nucleolen liegen im Kernnetz verteilt; das Kernnetz steht überall mit der Membran im Zusammenhang. Dann löst sich das Kerngerüst von der Kernmembran ab, zunächst nur an einzelnen Stellen, später liegt das zusammengezogene Kerngerüst mit den Nucleolen frei im Kernhohlraum (Fig. 3). Zwischen Gerüst und Membran entsteht ein Zwischenraum, der ein außerordentlich schwach färbbares Netzwerk enthält. Die Kernmembran wird knitterig, zuweilen kann sie auch abgerundet bleiben. Das zusammengezogene Kerngerüst nimmt oft eine halbmondähnliche Form an (Fig. 6 u. 7). Die Nucleolen werden zu blasigen Kugeln, das Chromatin befindet sich an der Oberfläche; die einzelnen Waben der Nucleolen fließen zusammen (Fig. 4). Schließlich fallen die Nucleolen einem körnigen Zerfall anheim (Fig. 5, 6 u. 7), die einzelnen Körnchen verteilen sich, der ganze Inhalt des Kernes wird sehr schwach färbbar (Fig. 8). An degenerierenden Kernen habe ich eine Beobachtung gemacht, welche zeigt, wie elektiv das von mir hauptsächlich benutzte Hämalaun nach P. MAYER färbt. Bei Doppelfärbungen mit Karmin nach BEST zeigt es sich nicht selten, daß außer dem Kohlehydrat auch der degenerierte Kern rot gefärbt ist; Karmin nach BEST färbt eben außer Kohlehydraten auch Chromatin; lebendes Chromatin wird durch Hämalaun vorgefärbt, totes dagegen nicht, aber Karmin färbt es doch noch stark.

Während der Cystenruhe gehen wichtige Veränderungen mit den Chromidien vor sich. Im Anfang liegen sie wie im unencystierten Tier hinten und umgeben den zentral liegenden Kern; bald jedoch wird dieser an eine beliebige Stelle an der Oberfläche gedrängt, seine Degeneration verläuft neben der Entwicklung der Chromidien. Diese verteilen sich durch die ganze Cyste und bilden sich in zahlreiche Stränge um. Dann tritt eine Reduktion der Chromidien

ein; vorn in der Cyste bildet sich eine Kappe aus Chromidien und Nahrungsbällen; es entsteht ein Stück einer neuen Cystenmembran, die an den Seiten in die alte übergeht. Der überflüssige Teil der alten Cystenmembran platzt auf; und die Reduktion der Chromidien ist beendet (Fig. 2). Auch einzelne Nahrungsbälle können auf dieselbe Weise aus der Cyste entfernt werden, so sah ich in einer lebenden Cyste einen braunen Nahrungsklumpen zwischen zwei Membranen eingeschlossen; daß eine solche Ausscheidung häufig stattfindet, läßt die Beobachtung vermuten, daß im allgemeinen junge Cysten mehr Detritus enthalten als alte.

Jetzt zeigen die strangförmigen Chromidien ein strahliges Aussehen (Fig. 3); an der Cystenoberfläche beginnen sie mit breiter Basis, um dann, schmaler werdend, sich spitz gegen die Cystenmitte zu richten; einzelne Ringe und Brocken suchen sich dann hier zu vereinigen.

Die Stränge fließen zusammen, sie bilden einen wabig gebauten, im Anfang unregelmäßigen Kern, der radial gerichtete Fortsätze ausbildet, an denen die Chromatiringe und -brocken entlang gleiten (Fig. 4). Es bleiben noch Chromidien übrig, sie werden jedoch zu dem degenerierenden Kern an die Wandungen gedrückt und degenerieren auch.

Auf diesem Stadium wird das in den Cysten eingeschlossene Kohlehydrat verbraucht. Wenn die Chromidien zusammenfließen, werden die Kohlehydratkörner frei und lösen sich im Plasma auf; im nach BEST gefärbten Präparat ist das Plasma diffus rot gefärbt, es treten viele winzige, lichtbrechende, ungefärbte Granula auf, dann verschwindet die rote Plasmafärbung, auch die Granula fallen wieder einer Auflösung anheim. Fig. 4 zeigt ein Tier während der Auflösung des Kohlehydrats; diese findet immer während des Zusammenfließens der Chromidien statt, die Granula sind auch nur während dieser Zeit vorhanden. Charakteristisch für dieses Stadium ist gleichfalls die scharfe Grenze zwischen dem Plasma und den degenerierenden Chromidien, deren Waben übrigens noch vereinzelt Kohlehydratkörner aufweisen.

Während die Granula verschwinden und die degenerierenden, schwächer färbbaren Chromidien ins Plasma wiederum eintreten, nimmt der Chromidialkern eine regelmäßigere Form an (Fig. 5); es wird alles Chromatin aufgenommen, der wabige Teil kugelt sich ab; die strahligen Fortsätze, anfangs noch chromatinhaltig, sind jetzt alle gleich lang, oben scheinen sie zum Teil verbreitert zu sein. Der Zwischenraum zwischen den Strahlen ist von einer Sub-

stanz erfüllt, welche stärker färbbar ist als das Plasma. In Fig. 7 ist auch das Chromatin der strahligen Fortsätze eingezogen worden, der Chromidialkern besitzt jetzt außen eine Schicht schwach färbbarer Alveolen. In Fig. 7 haben sich die degenerierenden Chromidien zum Teil zusammengeklumpt.

Selten kommt es zur anormalen Ausbildung von zwei Chromidialkernen (Fig. 6); ich habe nur drei Tiere mit zwei Kernen, dagegen Hunderte von Tieren mit einem Chromidialkern gesehen; eines der anormalen Tiere steht auf derselben Entwicklungsstufe wie Fig. 4, eines ist in Fig. 6 abgebildet, eines ist diesem ähnlich. Einzelne Tiere mit hantelförmigem Chromidialkern lassen mich vermuten, daß diese Tiere nicht degenerieren müssen, sondern daß sie noch nachträglich durch Verschmelzung zu einem einzigen Chromidialkern gelangen.

Fig. 7 zeigt, daß der Alveolensaum um den Chromidialkern schmaler wird, er ist zuletzt verschwunden, und es beginnt jetzt wieder die Auflösung des Chromidialkernes; die degenerierten restlichen Chromidien sind bis auf einige schwach angedeutete Ringe resorbiert. Fig. 8 zeigt eine fortgeschrittene Chromidialkernauflösung; ich besitze ein Präparat eines Tieres, in welchem dieser Vorgang beendet ist. Soweit habe ich die Entwicklung zusammenhängend verfolgen können. Jetzt fehlen mir Übergangsstadien zu Fig. 9; auf dieser Zeichnung ist eine geplatze Cyste dargestellt, welche ungefähr 18 Chromidialkugeln enthält, und außerdem die Überreste des alten Kernes; ich habe den indifferenten Ausdruck „Chromidialkugeln“ gewählt, weil mir ihr Schicksal unbekannt ist. Das Innere der Kugeln besteht aus Plasma, außen folgt eine Schicht von Chromidialsubstanz, in der sich einzelne Chromidialringe befinden, an denen sich das Chromatin an einer Seite angesammelt hat. Einen Kern besitzen die Chromidialkugeln nicht. Ich möchte sie in den Entwicklungsgang der *Nebela* einstellen, weil die Cyste außer dem degenerierten Kern keinerlei Detritus enthält, auch weil die Kugeln ungefähr gleich groß sind.

Die Erkenntnis des Entwicklungsganges wurde erschwert durch eine beträchtliche Zahl von Parasiten; ich will an dieser Stelle nur ganz kurz auf sie eingehen.

Längere Zeit glaubte ich, daß der Cysteninhalte in Amöben zerfalle, die im Habitus denen ähnlich sind, welche für *Arcella* beschrieben werden. Jedoch enthalten solche Cysten außer den Amöben noch viel restliches Plasma und Chromidien; dazu kommt, daß dieselben Amöben im Plasma unencystierter Nebelen auch parasitisch

vorkommen. Zuweilen waren die Amöben in der *Nebela*-Schale encystiert, die Größe der einzelnen Cysten schwankte dann außerordentlich, was auch darauf schließen läßt, daß sie als Parasiten aufzufassen sind.

Als Parasiten treten ferner kleine Flagellaten im Plasma auf, Bakterien bringen den Kern zum Quellen und drücken die Nucleoli an die Kernmembran. Außer Amöben, Flagellaten und Bakterien kommen noch zwei Parasiten vor, die ich nicht einzuordnen vermag; einer dieser beiden encystiert sich oft an der inneren Schalenwand der *Nebela*, ich habe von ihm nur vielkernige Stadien gefunden, seine Kerne bestehen aus drei oder vier Alveolen, seine Cystenmembran ist braun. Dann fand ich noch eine ganze Reihe von Stadien des anderen Parasiten, dessen kuglige Cyste kleiner ist als die *Nebela*-Cyste; ich fand solche Cysten mit einem, mit zwei und mit zahlreichen Kernen, ich vermute, daß aus ihr Schwärmer des Parasiten hervorgehen. Auf die Parasiten werde ich in der ausführlichen Arbeit näher eingehen.

Die beschriebene Entwicklung gilt für *N. collaris*, jedoch habe ich auch von zwei anderen Formen, von *N. militaris* PENARD und von *N. lageniformis* PENARD, zufällig je ein Stadium gefunden, welches einen Chromidialkern aufweist; ich darf deshalb wohl den Entwicklungsgang dahin verallgemeinern, daß bei allen Nebelen während der Cystenentwicklung das Chromatin der Chromidien sich zu einem Chromidialkern vereinigt. Die Kernverhältnisse der *Testacea* sind in eine gewisse Beziehung zu setzen zu denen der *Ciliata*. Dem somatischen Großkern der *Ciliata* entspricht der somatische, auf einer gewissen Stufe degenerierende Kern der *Testacea*, dem generativen Kleinkern der *Ciliata* entsprechen mit Vorbehalt die generativen Chromidien der *Testacea*. Ob auch bei anderen Gattungen als bei *Nebela* ein Chromidialkern auftritt, müssen spätere Untersuchungen zeigen.

Die Chromidienlehre ist in neuerer Zeit verschiedentlich angegriffen worden, besonders wurden die Systeme angefochten. Es ist aber stets betont worden, daß die Grenzen der verschiedenen Gruppen unscharf wären. Das vegetative Chromatin ist als chemisch verändertes generatives Chromatin aufzufassen, und Kerne und Chromidien werden als generativ oder vegetativ bezeichnet, je nachdem ihr Chromatin in geringerem oder stärkerem Maße chemisch verändert ist. Diese Veränderung findet ihren Ausdruck in der Funktion der Kerne oder Chromidien.

DOFLEIN 1907¹⁾ hält nach eigenen Untersuchungen die Chromidien für ausgesprochen vegetativ. KHAINSKY 1911²⁾ bestreitet sogar die chromatische Beschaffenheit der Chromidien; er glaubt, sie seien Ansammlungen von Verdauungsgranula. Es scheint in der Tat ein gewisser Zusammenhang zwischen Kohlehydratbildung und Chromidien zu bestehen, aber auch der Kern einer einkernigen Zelle hat vegetative Funktionen zu erfüllen; den Chromidien der *Testacea* braucht man solche nicht abzusprechen. HARTMANN 1911³⁾ findet gleichfalls, daß das Chromidialnetz rein vegetativ ist. Die Gameten, die bei *Diffugia* und *Chlamydothryx* aus den Cysten hervorgehen sollen, sind nach ihm als Parasiten aufzufassen. Es ist möglich, daß wirklich Parasiten vorlagen, und daß die Vorgänge in der Cyste in ganz anderer Weise verlaufen, vielleicht ähnlich wie bei *Nebela*. HARTMANN⁴⁾ hatte 1909 diese Anschauung noch nicht. Er hielt die Chromidien damals für „polyenergisch“ und vermutete, daß die Chromidien bei *Centropyxis* durch fortgesetzte Teilung eines nebenkernartigen Gebildes entstanden. Ein solches Gebilde kann auch bei Diffugien vorkommen, wie aus einer Zeichnung hervorgeht welche Dr. S. v. PROWAZEK mir freundlicherweise überließ. Das Gebilde scheint pathogener Natur zu sein. Die wirkliche Chromidienbildung erfolgt vielleicht auf die Weise, welche POPOFF⁵⁾ für *Arcella* beschrieben hat. Ich konnte eine ganz ähnliche Abspaltung von Chromidien vom Kern bei *Euglypha* beobachten. Es ist ein Zusammenhang zwischen Chromidien der *Testacea* und Mitochondrien vermutet worden. Wenn den Mitochondrien überhaupt eine Bedeutung für die Vererbung zukommt, so sind sie doch sicher nicht die alleinigen Vererbungsträger, während die Chromidien der *Testacea* wohl als solche aufzufassen sind; deshalb halte ich einen Vergleich von Mitochondrien und Chromidien für unstatthaft. Der einzige Beweis für die vegetative Natur der Chromidien wäre der Nachweis, daß der Kern allein eine Rolle bei den Vermehrungserscheinungen spielt. Er ist nicht erbracht worden. Dagegen sprechen zahlreiche Beobach-

¹⁾ F. DOFLEIN: Fortpflanzungserscheinungen bei Amöben und verwandten Organismen. Sitz.-Ber. Ges. f. Morph. u. Phys. Bd. 23 München 1907.

²⁾ A. KHAINSKY: Untersuchungen über Arcellen. Arch. f. Protistenk. Bd. 21 1911.

³⁾ M. HARTMANN: Die Konstitution der Protistenkerne und ihre Bedeutung für die Zellenlehre. Jena 1911.

⁴⁾ M. HARTMANN: Polyenergische Kerne. Studien über multiple Kernteilung und generative Chromidien bei Protozoen. Biol. Centralbl. Bd. 29 1909.

⁵⁾ M. POPOFF: Über die Entwicklungsregeln von *Amoeba minuta*. Arch. f. Protistenk. Bd. 22 1911.

tungen, auch die Befunde bei *Nebela*, für die generative Bedeutung der Chromidien.

Tafelerklärung.

Tafel 19.

Alle Figuren sind bei Anwendung von ZEISS Imm. 2 mm, Oc. 4 mit dem ABBE'schen Zeichenapparat skizziert. Die Vergrößerung beträgt 700. Sämtliche Figuren stellen Stadien aus der Entwicklung der *Nebela collaris* var. *bohemica* dar.

Fig. 1. Unencystiertes Tier, in die Schale zurückgezogen. Nur wenige Nahrungsballen mit dargestellt. Hämalau.

Fig. 2. Reduktion der Chromidien. Unter der Kappe, die aus Chromidien und Nahrungsballen gebildet ist, befindet sich ein Stück Cystenmembran, das an den Rändern in die alte übergeht. Die Schale ist durch Schalenplatten verschlossen. Hämalau.

Fig. 3. Strahlige Anordnung der Chromidien. Schale ebenfalls durch Schalenplatten verschlossen. Hämalau.

Fig. 4. Die Chromidien fließen zu dem Chromidialkern zusammen. Die strahligen Fortsätze sind noch verschieden lang. Die restlichen Chromidien werden durch körniges Plasma zu dem alten Kern an die Oberfläche gedrückt. Pikrokarm.

Fig. 5. Die strahligen Fortsätze des Chromidialkerns sind gleich lang, sie enthalten noch Chromatin; zwischen ihnen befindet sich eine stärker färbare Substanz. Alaunkarm.

Fig. 6. Anormale Ausbildung von zwei Chromidialkernen. Alaunkarm.

Fig. 7. Die Fortsätze des Chromidialkerns enthalten kein Chromatin mehr, sie bestehen aber als Alveolenwände fort. Reste der Chromidien sind verklumpt, ganz wenige schwach färbare Ringe im Plasma. Hämalau.

Fig. 8. Auflösung des Chromidialkerns. Hämalau.

Fig. 9. Geplatzte Cyste. Im Innern liegen ungefähr 18 kernlose Chromidialkugeln, von denen nur fünf dargestellt sind. Außer den Kugeln enthält die Cyste nur den degenerierenden Kern, der nicht mitgezeichnet wurde. Hämalau.

**Struttura ed evoluzione dell'organo simbiotico di
Pseudococcus citri RISSO, e ciclo biologico del
Coccidomyces dactylopii BUCHNER.**

Pel

Dr. Umberto Pierantoni,

Professore inc. di Parassitologia, Aiuto nell'Istituto Zoologico della R. Università
di Napoli.

(Colle tavole 20—22.)

Dal tempo in cui, or son tre anni, mi riuscì di mettere in chiara luce il fenomeno della simbiosi ereditaria, e di dare così il loro giusto valore ad una serie di fatti incompletamente osservati o male interpretati riguardanti l'organizzazione e l'embriologia degli insetti, una ricca letteratura su tale argomento è apparsa, specialmente per opera di zoologi tedeschi, e gli animali che di tali fenomeni danno esempj sono andati assai aumentando di numero nella letteratura. Da ulteriori studj, intanto, che io sono andato compiendo a fine di estendere ancora di più le conoscenze su questa simbiosi e sulla sua importanza nella organizzazione del regno animale, ho potuto concludere che, fra gli animali a simbiosi bisogna distinguere due grandi categorie, e cioè: a) animali che posseggono organi simbiotici ben definiti, ossia appositi ed esclusivi per la ricettazione dei microrganismi; b) animali in cui i microrganismi risiedono diffusi in diversi organi aventi sede specialmente nel lacunoma.

Nella prima di queste categorie, giusta gli studj fino ad ora compiuti, bisogna comprendere *Icerya*, *Pseudococcus (Dactylopius)* fra i Coccidi, ed alcuni Aleurodidi; *Aphrophora* e *Ptyelus* fra i Cercopidi;

credo inoltre di potere affermare che bisogna mettere nella medesima categoria tutti gli Afidi, i Fillosserini ed i Chermidi per la speciale formazione di cui sono provveduti (pseudovitello). Infine bisogna ascrivere alla prima categoria anche tutti i Cicadidi, quantunque solo alcuni siano stati studiati, mentre va in tale categoria certamente il genere *Aphalara* fra i Psillidi. Nella seconda categoria sono da annoverare fra i Coccidi i *Coccus*, molti *Lecanium* (*oleae*, *hesperidum*), i Diaspidi nel maggior numero, i *Ceroplastes*; fra le altre famiglie di Omotteri molti Jassidi e Fulgoridi.

La suaccennata distinzione trova sua ragione non soltanto nell'anatomia, ma anche l'embriologia dei differenti animali; e ciò perchè tutti quelli appartenenti alla prima categoria nel loro sviluppo permettono di seguire la formazione di un vistoso, speciale organo, che appare nel suo abbozzo fin dai primi stadii della vita embrionale e che è destinato a dare l'organo ricettatore dei microrganismi (massa polare, corpo ovale, pseudovitello embrionale). Quelli della seconda categoria, invece, non presentano alcuna speciale formazione od organo embrionale per la ricettazione di essi: ma è possibile di scorgere come i microrganismi restano in essi raggruppati in determinati punti per diffondersi e penetrare poi in varii organi a misura che questi si vanno formando.

In precedenti lavori ho già data una particolareggiata illustrazione dei fatti in un tipico esempio appartenente alla prima categoria: la simbiosi in *Icerya purchasi*. Nel presente scritto mi limito per ora ad illustrare un secondo caso, appartenente anch'esso alla medesima categoria, ma che per molti rapporti merita una speciale considerazione: tali rapporti consistono tanto nella forma e maniera di aggregazione dei microrganismi, quanto nella forma e disposizione dell'organo ricettatore (corpo ovale). Mi riservo di dare in altro lavoro una completa illustrazione di casi appartenenti alla seconda categoria; della quale alcuni esempj dà il BUCHNER in un suo recentissimo lavoro sull'argomento (1912). In questo l.^a, riassumendo quanto fu da me e da altri ossevato, espone i fatti inerenti alla simbiosi di Coccidi ed Aleurodidi, di Afidi, Cicadidi, Cercopidi ecc. dando anche notizia di quanto è noto sulla simbiosi in altri insetti non Emitteri.¹⁾

Nel dare alle stampe il presente lavoro mi è grato inviare i sensi di vive grazie al Prof. MONTICELLI, che, quale direttore dell'Istituto ove esso fu compiuto, facilitò in ogni modo ed in ogni tempo le mie ricerche, ponendo a mia disposizione i mezzi opportuni.

¹⁾ In questa esposizione al BUCHNER è sfuggito il lavoro del PORTIER (1911) sulla simbiosi nelle larve xilofaghe di *Nonagria*, viventi in fusti di *Typha latifolia*.

Materiale e tecnica.

Il materiale per lo studio del *Pseudococcus citri* è fra i più agevoli a procurarsi e a conservarsi, per la frequenza con cui s'incontra sulle piante d'agrumi in genere e di limone in ispecie nonchè su moltissime altre piante. Ma per chi voglia tenere il materiale in modo da disporre con ogni facilità di individui di ogni età e di ogni sesso, non esclusi i maschi alati, io consiglio di allevare, come da tempo ho praticato, questo parassita su patate, poichè il *Pseudococcus* si adatta assai bene a vivere a spese di succhi vegetali che trae dalle gemme e dai giovani germogli che si sviluppano su questi tuberi. Se le patate coi suoi parassiti sono conservate a secco in vaschette di vetro con coverchio munito di sottilissima rete metallica, i maschi restano sempre imprigionati ed a portata di mano, e si ha il vantaggio di potere con tutta facilità su oggetti mobili, con l'aiuto del microscopio da dissezione, fare la ricerca delle uova embrionate e delle larve.

Per lo studio dell'organo simbiotico (corpo ovale) dell'adulto è assai utile la dissezione. Sotto il microscopio binoculare, con sottilissimi aghi, riesce abbastanza facile di isolare il detto organo in acqua, conservando tutti i microrganismi in vita ed in situ. Tratto l'organo simbiotico dal corpo dell'animale si possono con tutta facilità ottenere preparati dei microrganismi sia per strisciamento, schiacciando il corpo ovale e colorando coi metodi batteriologici, sia mediante tagli dell'organo. Le osservazioni sui microrganismi in situ fu fatto coi normali metodi delle sezioni microtomiche e delle colorazioni coi coloranti più in uso, e che (anche negli altri studii sui Coccidi mi diedero buoni risultati (emallume, ematossilina ferrica, fucsina).

Risultati negativi mi diedero le colture, quantunque operate sui più svariati terreni. Ma di ciò sarà detto più appresso.

L'organo simbiotico dell'adulto.

Il BERLESE per primo osservò (1893) una speciale formazione che si rinviene nel *Pseudococcus*, che chiamò corpo ovale; egli così la descrive:

„Tutto il tubo digerente riposa (nelle femmine di qualunque stato) su un ammasso di forma ovale, di cellule rotonde di 35—36 μ di diametro, con nucleo di 11—12 μ di diametro, ed uno o più nuclei,

che però si dilatano il più delle volte notevolmente, per infiltrazioni di grasso in goccioline. Tutti questi elementi sono racchiusi nella guaina unica, abbastanza disgregati fra loro, e immersi in detriti granulosi gialli, che col carminio si colorano intensamente, negli interstizii delle cellule. Questo corpo ovale è collocato in contatto della epidermide del ventre, e non sembra contornato da membrana alcuna. Quale sia il suo ufficio, e cosa rappresenti mi è ignoto. Certo è che esiste sempre, molto più grosso nel *D. citri*, dove occupa gran parte del ventre, più ridotto nel *D. longispinus*. Numerose trachee provenienti dal ramo longitudinale ventrale, che parte dall'ultimo stigma, vi penetrano, e colle tinture carminiche si colora abbondantemente, più di tutti gli altri tessuti, eccetto i glandulari.

Non ho osservato che quest'organo sia in rapporto con alcuna apertura, oppure con l'intestino. Questo vi si appoggia per quasi tutto il suo decorso, ma non sembra avere altre relazioni. Quando il corpo nell'adulto è pieno d'uova, queste si infossano entro le cellule del detto corpo ovale, che in questo caso occupano i vani esistenti fra le uova stesse.

È molto probabile che sia un ammasso di sostanza nutritiva, derivata dall'intestino, oppure abbia rapporti di difficile rilievo, colla secrezione della cera. È certo che non ne hanno tenuto parola gli autori, che mi hanno preceduto in queste ricerche.

Sugli esatti dati che il BERLESE espone nella sua descrizione, riguardo alla posizione di quest'organo rispetto all'intestino, ed in generale rispetto a tutti gli altri organi interni, è inutile insistere, e volentieri, per non ripetere fatti già noti, rimando alle sue figure d'insieme tratte da tagli; ugualmente non ripeto quanto riguarda le dimensioni dell'organo e degli elementi che lo costituiscono. Mi fermerò invece solamente sulla sua struttura, che, alla luce delle nuove conoscenze sugli organi simbiotici in generale, risulta alquanto differente da quanto si ricava dalla surriferita descrizione.

Il corpo simbiotico estratto, mediante la dissezione, da una femmina adulta aperta dal dorso, e distaccato dai due rami dell'ovario, con cui si trova in immediato contatto, appare come una massa ovale traslucida, di color giallo chiaro (tav. 20 fig. 1).

Osservata al microscopio, con debole ingrandimento, questa massa risulta composta da tante sferule strettamente addossate l'una all'altra, di color bianchiccio, contenenti a loro volta numerosi corpuscoli o granuli (fig. 1, *sf*). Frammisti alle sferule si notano numerosi rami tracheali (*tr*) originatisi specialmente dalla suddivisione di due

tronchi principali, che penetrano ai lati dell'organo, e verso la metà del suo maggiore diametro (*tr*). La particolare struttura dell'organo è messa in migliore evidenza dalle sezioni orizzontali, trasversali e sagittali di individui opportunamente colorati. Sui tagli tutta la massa dell'organo simbiotico presenta una forma irregolare pel fatto che essa è compresa e costretta fra gli organi del lacunoma, e, specialmente in animali sessualmente maturi, fra le numerose uova che la circondano e comprimono (tav. 20 fig. 2 e 4, *co*). Tutto l'organo risulta costituito da un ammasso di cellule di cui lungo il maggior diametro si contano circa una ventina, e circa dieci nel minore. Le cellule non sono fra loro compresse, e la loro massa è circondata da uno strato di cellule appiattite, che costituisce un epitelio involgente, delimitante la forma dell'organo (fig. 2 e 3, *ep*). Al difuori del rivestimento epiteliale notasi ancora a forte ingrandimento una membrana anista (*m*) difficile a distinguersi perchè sottilissima e spesso aderente allo strato epiteliale.

Le cellule appiattite del rivestimento epiteliale però non formano soltanto uno strato involgente, ma si insinuano anche fra le cellule della massa dell'organo, formando delle sorta di sottili tramezzi, riconoscibili per la presenza dei nuclei lievemente ingrossati e di forma ovoidale allungata (fig. 2 e 3, *tep*). Questi tramezzi delimitano nella massa camere comprendenti ciascuna più di una cellula (fig. 3, *ca*).

Le sferule che si vedono nell'organo quando si osserva a fresco (fig. 1) costituiscono il contenuto plasmatico delle cellule dell'organo stesso; il plasma di ciascuna di queste infatti è tutto occupato da dieci o dodici sferette, le quali alla lor volta sono ripiene dei corpuscoli sopra ricordati aventi varia forma, e sono delimitate nella loro forma da sottile membrana anista (tav. 20 fig. 1, 3, 9, *sf*). Fra le sferette si riconosce un poco di plasma libero (*pl*) ed il nucleo della cellula, che ha forma sferica od allungata, a seconda dello spazio che lasciano libero le sferule che lo circondano e che si comprimono le une colle altre, e contro il nucleo stesso (*nu*). Non di rado questo nucleo appare in via di divisione in diverse fasi della mitosi (fig. 9, *nu'*).

In complesso adunque la struttura del corpo ovale corrisponde a quella degli organi simbiotici degli altri Coccidi, i quali organi sono sempre costituiti da un ammasso di cellule rimpinzate di microrganismi, delimitato da uno strato epiteliale; ammasso che può essere unico o diviso in più gruppi di cellule, aventi ciascuno il suo epitelio involgente.

I microrganismi in *Pseudococcus* meritano speciale attenzione pel modo peculiare in cui si raggruppano formando le sferette innanzi descritte.

Se si isolano a fresco per mezzo di dilacerazione le sferette, si scorgè che esse sono in rapporto con le diramazioni ultime delle trachee, in modo che una di queste diramazioni giunge quasi a ciascuna sferetta (tav. 20 fig. 5, *tr*). Le sferule sono ripiene di corpuscoli talora rotondi (fig. 5), talaltra di forma semilunare od allungata (fig. 9) o addirittura vermiformi (fig. 3, 7, 8). Ma qualunque sia la forma dei detti corpuscoli, ciascuna sferula contiene, oltre a questi, uno o due corpicciuoli assai più grandi, trasparentissimi, e, di solito schiacciati come delle lenti o dischetti jalini (*dj*).

Per quanto riguarda la descrizione dell'organo simbiotico dell'adulto v'ha ancora da osservare che l'involucro epiteliale che lo riveste, fatto da cellule molto appiattite, è presente in tutti i punti della superficie dell'organo, ma mostra qua e là frequenti dilacerazioni, a causa delle quali in alcuni punti si distacca addirittura dalla massa cellulare (fig. 3, *dil*). In corrispondenza di queste dilacerazioni si vedono sovente venir fuori dalla massa del corpo ovale, e verso la superficie, sferule libere provenienti da cellule in via di disfacimento (*cdg*). Delle cellule che sono contenute nella massa dell'organo ripiene di numerose sferule, se ne notano di diverse sorta, e che si distinguono principalmente per la costituzione del nucleo e per la costituzione dei corpuscoli. Infatti mentre le cellule più interne sono tutte uguali, con nucleo a cromatina diffusa in granuli (fig. 3, *ce*), ovvero in fase di mitosi, verso la superficie se ne notano alcune in cui il nucleo, contornato da una zona protoplasmatica, è più piccolo e condensato in una massa piuttosto compatta di cromatina, ridotta in sottilissime particelle (fig. 3, *ce'*, *nu*). Fra queste cellule ve ne sono di quelle (*ce''*) che hanno la parete lacerata, e da esse vien fuori il contenuto protoplasmatico ed insieme le sferule che si fanno libere e fuoriescono dall'organo attraverso le dilacerazioni epiteliali. La concentrazione del nucleo è evidentemente un segno di digenerazione; difatti fra cellula e cellula dell'organo, verso la superficie del corpo ovale, si notano spesso delle masse di cromatina contornata da residui di protoplasma, le quali sono facilmente interpretabili come nuclei degenerati, di cellule disfatte (fig. 3, *nud*).

Accennavo più sopra al fatto che anche i corpuscoli variano di forma nelle varie sorta di cellule. Quantunque la loro forma possa essere varia anche nelle cellule in mitosi, più interne della massa del-

l'organo, è da notare che quelle che si trovano nelle cellule superficiali, e quelle delle sferule fattesi libere presentano sempre il carattere di essere più grandi e più intensamente colorabili, tanto coi coloranti plasmatici, che coi nucleari. Ora se si nota che questi corpuscoli sono appunto quelli destinati ad abbandonare l'organo simbiotico per compiere le ulteriori loro migrazioni, si vede ripetersi qui il fenomeno già da me illustrato a proposito della simbiosi d'*Icerya*, che cioè alcuni corpuscoli, e proprio quelli che sono sul punto di iniziare la loro migrazione dall'organo simbiotico, acquistano in tal momento caratteri molto evidenti per dimensioni maggiori e più accentuata affinità coi colori nucleari (lav. cit. p. 57 e 58).

Come ho notato in una precedente nota (1910) l'organo simbiotico ora descritto esiste non solo costantemente in tutte le femmine (larve ed adulti), ma anche nelle larve e nelle immagini dei maschi. In questi però, mentre il corpo ovale nelle più piccole larve ha le identiche proporzioni che nelle femmine, non progredisce più nello sviluppo in corrispondenza dell'accrescimento dell'animale, anzi nei maschi adulti subisce una certa regressione, si che in questi costituisce una formazione di proporzioni assai ridotte. Tale minore sviluppo dipende dal fatto che nel corpo dei maschi vi sono condizioni meno favorevoli alla vita ed allo sviluppo dei microrganismi, per il differente loro regime di vita. La presenza dell'organo simbiotico nei maschi fu da me dimostrata anche in *Icerya* (1913) almeno per quanto riguarda le larve, nelle quali assume uno sviluppo identico a quello che presenta l'organo nelle larve femminili. Fra l'organo simbiotico d'*Icerya* e il corpo ovale di *Pseudococcus* esiste grande somiglianza, malgrado che si presentino così differenti nella forma; in *Icerya* difatti l'organo a blastomiceti è pari e fatto di più pezzi; ma l'importanza di questa differente costituzione dell'organo risulta solo apparente, se si nota che, nello sviluppo d'*Icerya* esiste, come ho dimostrato in altro lavoro (1913), un periodo embrionale in cui l'organo simbiotico è di un sol pezzo, impari e mediano, come in *Pseudococcus*. Il corpo ovale potrebbe perciò interpretarsi come una forma relativamente primitiva di organo simbiotico.

La trasmissione ereditaria.

La posizione dell'organo simbiotico, che, come s'è visto, è strettamente aderente all'ovario, quantunque sia con esso a semplice contatto, rappresenta una condizione favorevole alla trasmissione ereditaria dei microrganismi. Questi infatti, liberatisi dal corpo ovale, nella maniera innanzi descritta, passano in gran numero nelle

uova, percorrendo una via costante, attraverso cioè le cellule nutrici ai fianchi del cordone nutritivo. Osservando nelle sezioni tutte le uova che si trovano in un ovario di una femmina matura, si possono seguire tutte le differenti fasi di questa migrazione, la quale coincide con l'accrescimento dell'uovo e col riassorbimento delle cellule nutrici. Le sferule a microrganismi che si sono rese libere dal corpo ovale, penetrano direttamente nella porzione basale del gruppo delle nutrici, e si accumulano intorno al cordone nutritivo, che mette in comunicazione il gruppo delle nutrici stesso col plasma oocitale. Queste sferule, durante la loro permanenza in prossimità del cordone nutritivo, si trovano in condizioni identiche a quelle innanzi descritte (p. 305—306) che hanno abbandonato il corpo ovale, sia per la forma, che pel numero dei microrganismi che esse contengono (tav. 20 fig. 3; tav. 21 fig. 10, *sf*). Esse restano ivi ammassate fino al completo riassorbimento delle nutrici stesse. Quando l'uovo ha raggiunto il suo completo accrescimento, come in *Icerya*, il chorion, che ha incominciato a formarsi durante il periodo dell'accrescimento, e lo strato follicolare (epitelio coriogeno) incominciano a distaccarsi l'uno dall'altro, formandosi fra essi ed intorno all'uovo uno spazio, entro il quale va a terminarsi il cordone nutritivo oramai semi-atrofico (fig. 13—17, *spo*); ora è proprio in questa camera o spazio che le sferule a corpuscoli, allontanandosi dalle nutrici, vanno a cadere, per passare poi nel plasma dell'oocite (tav. 21 fig. 16, *sf*). Bisogna però notare che il processo non avviene sempre in maniera identica, e che, di solito, alcune sferule penetrano nell'uovo quando le cellule nutrici non sono ancora del tutto riassorbite nè il chorion definitivamente formato. In ogni modo la presenza delle numerose sferule a corpuscoli al polo anteriore dell'uovo disturba in quel punto la completa formazione del chorion, ritardandola alquanto; ciò permette anche alle sferule che non vi siano penetrate prima, di penetrare nel plasma oocitale, di penetrarvi cioè quando la camera è già formata pel distaccarsi dell'epitelio coriogeno dal chorion oramai completamente costituito.

È regola pressochè costante che entro il plasma dell'oocite penetrino sferule intiere, e costituite come quelle che si rinvengono nelle nutrici. Però in alcuni casi ho potuto constatare nella camera sopra descritta, corpuscoli liberi di forma varia, pervenutivi, come è verosimile, per la rottura di alcune sferule. Ora poichè questi corpuscoli spesso si presentano di forma alquanto più allungata (tav. 21 fig. 16, *cor*) di quelli contenuti nelle sferule, ritengo probabile che durante il periodo della penetrazione di queste sferule si inizii

un processo moltiplicativo dei corpuscoli, che determini l'aprirsi di alcune sferule in cui questo processo è più attivo; e ciò mi fa arguire anche il fatto che io potei constatare la penetrazione di corpuscoli isolati, destinati senza dubbio a formare nuove sferette dentro l'uovo. Il che trova riscontro col fatto che anche in *Icerya* i corpuscoli si presentano al polo di penetrazione dell'uovo (polo posteriore in quel caso) nelle forme caratteristiche della moltiplicazione dei blastomiceti. E che vi sia una attiva moltiplicazione dei corpuscoli, nel periodo della penetrazione e poco dopo, lo dimostra, oltre la forma dei corpuscoli, anche il fatto che le sferule che si rinvengono al polo anteriore dell'uovo e che vi formano l'ammasso sferico (che costituisce come si vedrà, l'abbozzo del corpo ovale dell'adulto) sono in numero sensibilmente maggiore di quelle che si rinvenivano entro la porzione basale del gruppo delle nutrici; inoltre in questo ammasso sferico non di rado si rinvengono minuscole sferette contenenti un numero assai limitato di corpuscoli, interpretabili come sferule all'inizio della loro formazione da corpuscoli penetrati isolatamente, ovvero liberatisi da altre sferule. Dal complesso dei fatti si è quindi autorizzati ad ammettere che la moltiplicazione delle sferule, che avviene nell'atto e poco dopo la penetrazione nell'uovo, ha luogo mediante la moltiplicazione di corpuscoli resisi liberi pel rompersi di alcune sferule penetratevi. La membranella anista che involge le sferule è prodotta, evidentemente, dall'attività dei corpuscoli medesimi.

Tale attività nella formazione di una membrana involgente si dimostra anche nella formazione di una membrana unica che circonda tutto l'ammasso delle sferule al polo anteriore, quando si è completata la loro penetrazione e moltiplicazione; ammasso che assume una forma perfettamente sferica (fig. 17, *mp*), ma che può apparire talora di forma più o meno irregolare, dovuta probabilmente alle manipolazioni necessarie pei tagli microtomici.

La sfera fatta di sferule, che corrisponde esattamente alla cosiddetta massa polare oramai riconosciuta nella embriologia di tutti gli insetti che posseggono organi simbiotici (*Icerya*, Afidi ecc.), permane al polo anteriore, od in prossimità di esso, durante le prime fasi dello sviluppo dell'uovo, ossia durante la segmentazione e la formazione del blastoderma.

L'evoluzione embrionale dell'organo simbiotico.

Quando l'uovo inizia la sua segmentazione, la massa polare, fatta dalle sferule a corpuscoli, ha di solito raggiunta la forma

sferica per la presenza della membrana involgente e si trova verso il polo anteriore dell' uovo (fig. 17, *mp*). Tuttavia non è raro il caso in cui la formazione di detto ammasso sferico ha luogo durante il processo di segmentazione (fig. 15, *mp*). In tal caso si vedono al polo anteriore un certo numero di sferule, quasi aderenti al chorion (*ch*) e disordinatamente raccolte, costituenti la massa polare, mentre i primi blastomeri già sono apparsi nella massa vitellina.

La massa polare in tal caso acquista la forma sferica solo allorché ad essa si sono aggiunte alcune cellule originatesi dalla segmentazione dell' uovo, le quali, ravvolte dalla membrana che si va formando intorno ad essa ed ai corpuscoli, costituiscono il vero abbozzo embrionale del corpo ovale (organo simbiotico).

Il processo di formazione di questo abbozzo si inizia per migrazione di cellule provenienti dalla segmentazione dell' uovo verso il polo anteriore: cellule che dapprima circondano la massa polare rimanendo ad essa aderenti (fig. 15, *bl*) e poi si insinuano anche fra le sferule, in modo da accorglierle nella loro massa protoplasmatica.

Nel caso in cui la massa polare ha assunto la forma sferica prima dell' inizio della segmentazione, il processo avviene in modo pressochè uguale, perchè alcuni dei primi blastomeri vanno ad involgere la massa medesima, penetrando in questa.

La massa polare costituita oramai di cellule e corpuscoli fusi insieme, si approfonda alquanto nella massa vitellina dell' uovo durante la formazione del blastoderma, mentre al polo posteriore si determina lo spessimento (piastra ventrale) che prelude alla formazione della fascia germinativa. Ma a questo punto dello sviluppo embrionale, per una sorta di attrazione, questa massa polare migra attraverso il vitello verso il polo posteriore dell' uovo, raggiungendo l' estremo dell' inizio della suddetta fascia germinativa; ma poi, spinto dal proliferare delle cellule di questa, retrocede per ridursi nuovamente al polo anteriore dell' uovo (tav. 22 fig. 18, *mp*).

La massa polare conserva tale posizione durante il primo sviluppo dell' embrione. In *Pseudococcus*, come in molti altri coccidi, le uova abbandonano l' ovario quando in esse è già formata la fascia germinativa, e quindi si sono già determinati il blastoderma, l' amnios, l' ectoderma ed il mesoderma. Durante questo periodo la massa polare, rimasta al polo anteriore, non ha subito notevoli modificazioni, salvo un accrescimento della sua massa dovuto a proliferazione di cellule.

Ora, dato che il proliferare delle cellule della massa polare è più rapido del moltiplicarsi delle sferule in essa raccolte, come di-

mostrano i frequenti nuclei in mitosi, non di rado in questa massa si notano zone in cui le sferule mancano del tutto.

Nell'ulteriore sviluppo dell'embrione la struttura della massa polare non varia, salvo il fatto del comparire ad essa d'intorno di uno strato di cellule epiteliali, che involgono prima lascamente, poi in istrato compatto le cellule portatrici dei corpuscoli.

Ma tale strato comincia ad essere evidente solo in embrioni molto avanzati; si può quindi dire che la massa polare durante lo sviluppo, oltre all'accrescersi, non subisce che variazioni di posizioni.

Nella tav. 22 sono rappresentate alcune figure, dalle quali si ricavano le diverse posizioni che occupa la massa polare (*mp*) durante la vita embrionale. Nelle figure sono riprodotte otto caratteristiche diverse posizioni dell'embrione rispettivamente e della massa. Il polo anteriore dell'uovo, eccetto la fig. 19, che è capovolta, è sempre in alto, in basso il posteriore, alla parte destra corrisponde la parte ventrale, a sinistra la dorsale dell'embrione nella sua posizione definitiva (salvo anche la fig. 21, che rappresenta un uovo embrionato visto dal lato ventrale).

Della embriologia dei coccidi si ha solo qualche notizia contenuta in vecchi lavori fra cui notevole quello del METSCHNIKOFF (1866) in cui questo autore si occupa brevemente della embriologia di *Aspidiotus nerii*; ma in essa non si rinviene che qualche figura e descrizione riguardante i primi e gli ultimi stadii dello sviluppo, tratte da osservazioni sul vivo; lo stesso va detto del lavoro del TARGIONI-TOZZETTI (1867). Il mio studio sulla evoluzione della massa polare, condotto principalmente sulle osservazione di sezioni e di uova diafanizzate, mi ha permesso di dare particolareggiate notizie riguardanti in ispecial modo la blastocinesi, la quale nel suo complesso si assomiglia a quella degli afidi, studiata da WILL, WITLACZIL e da altri, e va ricondotta al tipo generale, comune anche ai libellulidi, secondo gli studii condotti dal BRANDT su questi insetti.

La massa polare ritornata al polo anteriore, come si è detto sopra, respintavi dall'approfondarsi nel vitello della striscia embrionale, resta in tale posizione durante tutta la formazione dell'embrione. L'estremo della striscia embrionale, prolungandosi per formare la regione codale dell'embrione, s'incurva ventralmente passando al disotto della massa polare, in tal modo, quando tutto l'abbozzo embrionale è formato, la massa polare trovasi aderente alla regione dorsale di esso e propriamente addossata al sistema nervoso (*sn*), verso il limite fra la regione toracica e l'addominale (fig. 19, *mp*) dell'embrione. A questo punto l'embrione non ha ancora subito il rovescia-

mento che lo condurrà alla posizione morfologica definitiva. Tale rovesciamento (blastocinesi) si inizia col ripiegarsi verso l'alto della estremità codale (fig. 19, 20 e 21); questa curvatura non avviene nel piano di simmetria dell'embrione ma con uno spostamento in senso laterale verso la sinistra. Incurvandosi però verso l'alto la regione addominale finisce per insinuarsi colla sua estremità posteriore tra la massa polare e la membrana serosa, che limita tutta la massa vitellina (fig. 22, *se*), in modo che la massa polare, pur conservando la sua posizione rispetto all'abbozzo embrionale, viene a trovarsi compresa entro la curvatura della parte codale dell'embrione oramai decisamente ripiegata verso il dorso dell'abbozzo (lato ventrale dell'uovo).

Dopo la conversione in senso dorsale della parte addominale dell'embrione, incomincia immediatamente la vera blastocinesi, ossia il disporsi dell'embrione nella sua posizione morfologica definitiva. Tale processo s'inizia in basso nella regione cefalica, la quale si incurva verso la parte dorsale dell'embrione (ventrale dell'uovo, *rc*) e poi striscia lungo la parete ventrale dell'uovo trascinando seco le altre regioni, e risale fino a raggiungere la posizione definitiva al polo anteriore dell'uovo. Naturalmente questa migrazione dell'embrione ha per effetto di liberare l'embrione medesimo dal rivestimento amniotico (fig. 22—24, *am, se*) il quale da prima trovasi in contatto con la serosa nel punto della originaria invaginazione della striscia embrionale, ma poi, col vesciarsi dell'embrione, resta confuso con la serosa stessa e forma la parete dorsale della larva, nel modo già noto per i libellulidi e per altri omotteri (fig. 24, *am, se*).

In questa migrazione dell'embrione la massa polare, pur conservando la stessa posizione relativamente all'abbozzo embrionale, viene trasportata con esso (fig. 22—24, *mp*) verso il polo posteriore, spostandosi alquanto in direzione della parte ventrale dell'uovo; posizione che conversa durante l'ulteriore evoluzione dell'embrione in larva. Da questo stadio la posizione della massa polare rispetto agli organi interni (fig. 25, *mp*) corrisponde esattamente a quella del corpo ovale dell'adulto, ossia trovasi nel lacunoma, immediatamente al disopra (dorsalmente) alla catena ventrale del sistema nervoso.

La massa polare (corpo ovale) subisce solo un ulteriore spostamento quando si formano gli organi genitali, che, propagandosi dalla regione posteriore in avanti, entro il lacunoma, la spingono in senso anteriore fra i due rami dell'ovario o dei testicoli, fino a raggiungere la posizione che ha anche nell'adulto (tav. 20 fig. 4, *co*), in cui essa viene a trovarsi nelle femmine compressa entro la massa delle uova sporgentie daidurami dell'ovario.

Le fasi moltiplicative e la biologia del *Coccidomyces dactylopii* BUCHNER.

Sui dati da me esposti intorno ai blastomiceti simbiotici del *Pseudococcus* (= *Dactylopius*) *citri*, il BUCHNER nel suo recente lavoro sui simbiotici intracellulari degli omotteri (1912) ha costituito una specie micetologica col nome di *Coccidomyces dactylopii*, riassumendone in questa maniera i caratteri, che trae dalla mia nota preliminare (1910 b):

„Lebt im Mycetom (organo simbiotico) des *D. c.*, bildet dort in den Wirtszellen cystenartige Bläschen, in denen eine große Anzahl sichelförmig gekrümmte Organismen liegen, die von einer hellen Membran umzogen sind. Die Infektion geschieht durch ebensolche Bläschen.“

Riguardo a questa diagnosi è però da notare che non si può dare valore sicuro alla forma falcata perchè questa può variare moltissimo. La qualifica di falcata, data dal BUCHNER, fu desunta da una mia figura contenuta nella detta nota preliminare e trova la sua spiegazione nel fatto che negli esemplari che avevo osservato e sezionato nel tempo in cui scrissi per la prima volta su questo argomento, mi ero imbattuto in forme prevalentemente allungate ed incurvate di microrganismi. Ma in ulteriori osservazioni ho potuto rinvenire individui sferici o quasi sferici, allungati o cilindrici, ondulati o variamente ricurvi; e ciò tanto dentro che fuori le capsule o cisti, costituenti le piccole colonie.

La figura 6 della tavola 20 indica una serie di forme rinvenute nei diversi preparati di sezioni od ottenuti per strisciamento.

Nelle figure ricavate dalle sezioni (*a, b, c, d, e, g, m, n*) si riscontrano forme tondeggianti, quali prevalgono in organi simbiotici di individui raccolti in primavera, prelevandoli da colture ottenute su tuberi di patata; le forme lievemente allungate, a losanga od a cilindro ondulato prevalevano invece in organi simbiotici di individui osservati durante l'inverno, ed in colonie poste al polo animale ed entro le uova.

È però da notare che tutte queste forme, salvo la prevalenza di talune, sono sempre reperibili in ogni individuo. Le forme ottenute dai preparati per strisciamento (*f, h, i, l*) colorati col metodo batteriologico sono tutte allungate, ma talune mostrano verso la metà della loro lunghezza delle zone più chiare (*k*) che danno l'aspetto di individui in via di moltiplicazione per scissione. Come tali penso

possano interpretarsi anche le forme allungate ed ondulate (*l, m*): le quali forme ricorrono difatti assai spesso fra i blastomiceti, potendo considerarsi questa scissione uguale come una gemmazione modificata da una speciale condizione di ambiente, come ho dimostrato (1912), mediante le colture, per i blastomiceti che vivono in simbiosi con *Icerya* (*Coccidomyces pierantonii* BUCHNER). Come ho accennato a pag. 302 non mi è riuscito di ottenere, usando i metodi usuali, le colture di questi microrganismi in ambienti artificiali.

La condizione di questi organismi di essere riuniti in colonie, permette ad essi di sfuggire all'azione fagocitaria delle cellule del lacunoma. In questi animali, infatti, non si riscontrano le frequentissime cellule vaganti, cariche di microrganismi, che esistono in *Icerya* e che illustrai in altro lavoro (1912).

Io non sono in grado di dare una esatta interpretazione del corpuscolo sferulare o dischiforme che si trova in ogni colonietta v. pag. 305; esso è forse una concrezione, od altra formazione dovuta alle trasformazioni chimiche determinate dai microrganismi nell'ambiente in cui vivono.

Per chiudere queste osservazioni mi sembra opportuno di mettere ancora una volta in rilievo il fatto che i microrganismi simbiotici, ad ogni nuovo esempio che si studia, si rendono meglio interpretabili non come semplici simbionti, casualmente capitati od adattatisi a vivere nei loro ospitatori, ma come costanti ed importanti fattori di una ben determinata funzione; si noti infatti che essendo contenuti in appositi organi, che tanta importanza assumono sia nella vita embrionale che nella organizzazione dell'adulto, questi microrganismi debbono necessariamente avere un ben determinato ed importante ufficio nella economia degli animali che li ricettano.

Per quel che riguarda gli altri casi che fino ad ora ho illustrato, tale funzione fu da me posta in relazione con la ingestione dell'amido e dello zucchero abbondantissima nei coccidi ed in generale in tutti i fitofagi. Nel caso in esame non è difficile che il corpo ovale abbia una funzione analoga, ciò che è reso verosimile dall'esistenza di un sistema tracheale, ricchissimo di detta formazione (v. p. 303—304), devoluto forse alla emissione dei prodotti gassosi della scomposizione dello zucchero; e tale interpretazione è resa verosimile anche dal fatto già accennato, che nei maschi, che hanno vita effimera, il corpo ovale ha proporzioni assai più ridotte.

Napoli, Istituto Zoologico della R. Università, Dicembre 1912.

Bibliografia citata.

- 1869—1872 BALBIANI, E. G.: Mémoire sur la génération des Aphides. Ann. Sc. Nat. (5) T. 11 p. 17, T. 15 p. 21.
- 1893 BERLESE, ANT.: Le cocciniglie italiane viventi sugli agrumi. Parte I: I Dactylopius. Riv. Patol. Veget. Vol. 2 p. 1.
- 1911 BUCHNER, P.: Über intracellulare Symbionten bei zuckersaugenden Insekten und ihre Vererbung. Sitz.-Ber. Ges. Morph. Physiol. München p. 1.
- 1912 —: Studien an intracellularen Symbionten. I. Die intracellularen Symbionten der Hemipteren. Arch. Protistenk. Bd. 26 p. 1.
- 1866 METSCHNIKOFF, E.: Embryologische Studien an Insekten. Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 16 p. 468.
- 1910a PIERANTONI, U.: Origine e struttura del corpo ovale del Dactylopius citri, e del corpo verde dell'Aphis brassicae. (2. nota sulla simbiosi ereditaria.) Boll. Soc. Natur. Napoli Vol. 24 p. 1.
- 1910b —: Ulteriori osservazioni sulla simbiosi ereditaria degli Omotteri. Zool. Anz. Bd. 35 p. 96.
- 1911 —: Sul corpo ovale del Dactylopius citri. Boll. Soc. Natur. Napoli Vol. 24 p. 303.
- 1912 —: Studii sullo sviluppo d'Icerya purchasi MASK. Parte I: Origine ed evoluzione degli elementi sessuali femminili. Arch. Zool. Vol. 5 p. 321.
- 1911 PORTIER, P.: Digestion phagocytaire des chenilles xylophages de lepidoptères, exemple d'union symbiotique entre un insecte et un champignon. C. R. Soc. Biol. T. 70 p. 702.
- 1867 TARGIONI-TOZZETTI, A.: Studii sulle Cocciniglie. Mem. Soc. Ital. Sc. Nat. T. 3 No. 3.
- 1888 WILL, L.: Entwicklungsgeschichte der viviparen Aphiden. Zool. Jahrb., Abt. Anat., Bd. 3 p. 201.
- 1884 WITLACZIL, E.: Entwicklungsgeschichte der Aphiden. Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 40 p. 559.
-

Spiegazione delle tavole.

Lettere comuni alle figure:

<i>am</i> = amnios.	<i>mp</i> = massa polare.
<i>blt</i> = blastomeri.	<i>nu</i> = nucleo delle cellule del corpo ovale.
<i>ca</i> = camere o cavità del corpo ovale.	<i>nu'</i> = nucleo in mitosi delle stesse.
<i>cdg</i> = cellule del corpo ovale, in disfacimento.	<i>nud</i> = nucleo in degenerazione (delle cellule disfatte).
<i>ce</i> = cellule del corpo ovale.	<i>pl</i> = plasma cellulare.
<i>ce'</i> = cellule prossime a disfarsi.	<i>pi</i> = pigidio.
<i>ce''</i> = cellule disfatte.	<i>pv</i> = piastra ventrale.
<i>cen</i> = cellule nutrici.	<i>ra</i> = regione addominale.
<i>cen'</i> = cellule nutrici esaurite.	<i>rc</i> = regione cefalica.
<i>ch</i> = chorion.	<i>se</i> = sierosa.
<i>co</i> = corpo ovale.	<i>sf</i> = sferule a corpuscoli.
<i>con</i> = cordone nutritivo.	<i>sf'</i> = sferule idem libere dalle cellule.
<i>cor</i> = corpuscoli.	<i>sn</i> = sistema nervoso.
<i>dil</i> = dilacerazione dell'epitelio involgente del corpo ovale.	<i>spo</i> = spazio perioocitale.
<i>dj</i> = disco jalino.	<i>std</i> = stomodeo.
<i>ect</i> = ectoderma.	<i>te</i> = testa.
<i>ep</i> = epitelio.	<i>tep</i> = tramezzi epiteliali del corpo ovale.
<i>fol</i> = follicolo.	<i>tr</i> = trachea.
<i>m</i> = membrana involgente del corpo ovale.	<i>tr'</i> = ramuscoli tracheali.
<i>mes</i> = mesoderma.	<i>uo</i> = uova.

Tavola 20.

- Fig. 1. Corpo ovale isolato a fresco, per dissezione. $\times 120$.
 Fig. 2. Lo stesso, da una sezione. $\times 100$.
 Fig. 3. Porzione di una sezione dello stesso. $\times 2500$.
 Fig. 4. Sezione sagittale di una femmina adulta di *Pseudococcus citri*. $\times 30$.
 Fig. 5. Alcune sferule a corpuscoli con trachee e nucleo della cellula che le contiene, tratte per dissociazione ed a fresco dal corpo ovale. $\times 2500$.
 Fig. 6. Corpuscoli (*Coccidomyces dactylopii* BUCHNER) tratti dal corpo ovale di una femmina adulta. $\times 2400$.
 Fig. 7. Sferule isolate dal corpo ovale di una femmina adulta. $\times 2400$.
 Fig. 8. Le stesse, isolate dalla massa polare di un embrione. $\times 2400$.
 Fig. 9. Gruppo di cellule costitutrici del corpo ovale, contenenti sferule a corpuscoli. $\times 1200$.

Tavola 21.

- Fig. 10. Sezione del polo anteriore di un uovo in via di maturazione con nutrici presso ad esaurirsi. $\times 2400$.
 Fig. 11 e 12. Sezione di uova con sferule sul punto di penetrare nel plasma. $\times 220$.

Fig. 13. Sezione di oocito con gruppo di sferule già penetrate. $\times 220$.

Fig. 14. La stessa con gruppo di sferule già conformato a massa polare ed involto da membrana. $\times 220$.

Fig. 15. Sezione del polo anteriore di oocite in segmentazione, con massa polare in via di costituirsi. $\times 800$.

Fig. 16. Porzione di uovo con sferule ancora contenute nello spazio perioocitale e corpuscoli liberi. $\times 800$.

Fig. 17. Polo anteriore di oocite, con gruppo delle nutrici esaurito, e gruppo di sferule già conformate in massa polare e munite di membrana. $\times 800$.

Tavola 22.

(Ingrandimento di tutte le figure: $\times 350$.)

Fig. 18. Taglio di un uovo con abbozzo embrionale, passante per la striscia germinativa e per la massa polare.

Fig. 19. Taglio sagittale di un uovo con abbozzo embrionale. Questa figura è capovolta rispetto alle altre.

Fig. 20. Uovo diafanizzato contenente abbozzo embrionale, visto di lato.

Fig. 21. Idem, visto dal ventre.

Fig. 22. Uovo con embrione all'inizio del processo di rovesciamento (blastocinesi).

Fig. 23. Uovo con embrione in via di rovesciarsi, fuoriuscendo dalla cavità amniotica.

Fig. 24. Uovo con embrione che ha raggiunto la posizione definitiva.

Fig. 25. Sezione sagittale di un embrione prossimo e schiudersi in larva.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Observations on the life-history of CIENKOWSKI'S "Arachnula".

By

Clifford Dobell,

Fellow of Trinity College, Cambridge; Lecturer at the Imperial College of Science,
London, S. W.

(With plates 23 and 24.)

Contents.

	page
Introduction	317
Part I. Occurrence of <i>Arachnula</i>	319
Morphology of the vegetative form	319
Movements, etc.	324
Nutrition	325
Encystation and reproduction	329
Part II. Nomenclature	337
Systematic position of <i>Arachnula</i>	342
Some remarks on the nuclear phenomena exhibited by <i>Arachnula</i>	345
Literature references	350
Description of plates	351

Introduction.

In the year 1876 CIENKOWSKI published a description of a remarkable Rhizopod which he had observed living in fresh or brackish water. To this organism he gave the name *Arachnula impatiens*, and he was able to record some interesting facts about

its life-history. His observations seem to me to have been made — for the most part — with great accuracy: and as they were made chiefly upon living organisms, which he must have studied very carefully for a considerable time, they possess a much greater value than any subsequent observations which have been made by others on this form or those most closely related to it. From a cytological standpoint, CIENKOWSKI'S work is naturally very incomplete; though even in this respect it has not been surpassed by any later investigator.

So far as I have been able to ascertain, CIENKOWSKI'S "*Arachnula impatiens*" has been found by a number of other workers, at different times and in different places. But they have studied it merely in a superficial manner, and have done little more than give it several other names. Indeed, only one worker — PENARD (1903) — appears to have recognized the form originally studied by CIENKOWSKI. The organism studied by PENARD was obtained by him in an infusion of moss from Spitzbergen. He appears to have seen the commonest vegetative stages only, and has been able to add nothing of any importance to the earlier account.

I have more than once encountered the Rhizopod described by CIENKOWSKI, and I have on several occasions devoted considerable time to studying it. As far as my experience goes, however, the organism is rare: and moreover it is extremely difficult to study accurately — both when alive and when fixed and stained. I can add a good deal to CIENKOWSKI'S account, but my own observations are unfortunately far from complete. They seem to me worthy of publication, however, — because information regarding these organisms is greatly needed, because I have reached a point in my cytological observations at which further progress seems at present impossible, and because for some time all my cultures have died out, and I have been unable to obtain the organism again.

The naming of this Rhizopod has given me much difficulty. The forms which I have studied seem to me to be undoubtedly the same as those studied originally by CIENKOWSKI. But the accounts of this or a similar organism given by others are so meagre and unsatisfactory that I am unable to reach any definite conclusions regarding them. To understand the difficulties involved in nomenclature, it is necessary to know the life-history of the present form. I shall therefore describe this first, and shall then discuss the problem of nomenclature in a subsequent section (see p. 337). Though I am by no means satisfied that "*Arachnula impatiens*" is

the correct name (according to the rules) of my organisms, I shall call them by this in my description. It is, at all events, one of the names which have already been bestowed upon them.

Part I.

Occurrence of *Arachnula*.

I have met with *Arachnula* in fresh water only, and in only one locality — a part of the River Granta near Cambridge. The organisms live in the velvety layer of tangled Cyanophyceae and diatoms which coats the soft mud of the river bed at this place during certain seasons of the year. They live in company with many Protozoa and other Protista (*Amoebae* of the *proteus* group, many different Ciliata and Flagellata, *Closterium* and other Algae, Bacteria, etc.), together with Rotifera and occasionally other Metazoa (worms, tardigrades, larvae of Diptera, etc.).

Arachnula, and many of its companions, will live for a long time after transportation into the laboratory. I have kept my cultures in large glass dishes, renewing the water from time to time.

I have found *Arachnula* during the summer months only, but this may be merely a matter of chance.

Arachnula has previously been recorded (I give the certain records only) from freshwater ponds in Russia and Germany, and from the brackish water of the Black Sea at Odessa (CIENKOWSKI 1876); and in an infusion of moss from Spitzbergen (PENARD 1903).

Morphology of the vegetative form.

CIENKOWSKI'S diagnosis of *Arachnula impatiens* is as follows:

„Körper nackt, farblos, ohne Zellkern, mit einer oder mehreren kontraktilen Vacuolen, Pseudopodien wenig verzweigt, mitunter anastomosierend, an beliebigen Stellen des Körpers meist mit dicken Strängen entspringend“ (1876, p. 28).

This description requires some correction, but is in the main accurate.

An active *Arachnula* is so extremely amoeboid that its general form defies description. At one moment it may be compact and nearly globular, at another it may be stretched out into a long

cord, at another it may be flattened and leaf-like. It is frequently in the form of several nearly separate masses, connected by the most delicate protoplasmic threads. It is frequently also in the form of an irregular network. All these modifications may at times be seen at the same moment in different parts of the same organism. As a rule, a considerable number of very long and fine pseudopodia can be seen. They may be thrown out at any point on the surface of the body, but are usually to be seen more or less definitely disposed in tufts at the ends or angles. The pseudopodia frequently branch, and are occasionally connected with one another by extremely delicate transverse threads — like the pseudopodia of Foraminifera. Some idea of the sort of appearance presented by an *Arachnula* can be gained from CIENKOWSKI's figure (1876, plate V fig. 18) or from my fig. 2 (plate 23). Both these figures are of large specimens, but they may be taken as typical — in so far as any form can be called typical of so protean an animal. The body is naked. It shows in places a distinct differentiation into a granular endoplasm and a structureless ectoplasm. This differentiation is most marked in the region of the pseudopodia, — as can be seen in fig. 2, where the spatulate ends of the organism are shown in a characteristic condition.

During life, the organism is by no means always colourless as CIENKOWSKI states. It is often coloured a pale rose pink: but different individuals may be found which are completely colourless, or of the almost brick-red colour of *Vampyrella lateritia*, or of any intermediate shade. The colour depends upon the food of the organism (see p. 328 infra). PENARD (1903) states the colour of his organisms to have been a "bleu tendre", or "grisâtre" or "jaunâtre" in exceptionally large forms. I have occasionally seen yellowish or slightly orange-coloured individuals — but never blue.

It is impossible to make an exact statement regarding the dimensions of an organism of such an irregular and variable form as *Arachnula*. The longest individual which I have measured¹⁾ — in the form of an irregular band — was approximately 340 μ from end to end (not including the pseudopodia): but this was an unusually large specimen. A rough idea of the size can be obtained from fig. 2, which shows a large specimen magnified approximately 400 diameters. CIENKOWSKI (1876) does not mention the size of his organisms, but his figures (plate V figs. 18—20), drawn at a

¹⁾ A fixed and stained specimen.

magnification of 320 diameters, show that his forms were similar to mine in this respect. PENARD (1903) gives the size of his forms as 40μ to 330μ . He gives a diagram of a very irregular individual, which he says measures 200μ . But he does not say how he measures such an organism, so I presume that this represents the greatest diameter.

Contractile vacuoles are usually present in the protoplasm. They may be many or few, and sometimes appear to be absent altogether. They contract as a rule very slowly. Small organisms may contain about half a dozen, but large organisms may contain at least two or three dozen. (The small organism depicted in fig. 1 pl. 23, shows five vacuoles.) Some vacuoles are larger than others — the largest being about $2,5 \mu$ in diameter.¹⁾ They are not as a rule very easily observed, owing to the large amount of food usually present in the protoplasm and the frequently great activity of the animal. The vacuoles were observed by CIENKOWSKI, as we have seen, and have also been noticed by PENARD.

CIENKOWSKI (1876) believed that *Arachnula* was a non-nucleate organism. And PENARD (1903) states that he has never been able to discover "la moindre chose qui ressemblât à un noyau". „Sur des individus traités au carmin . . . rien n'a jamais apparu." He thinks it necessary to suppose, therefore, that *Arachnula* either contains no nucleus or that its nuclei „sont extraordinairement petits et ne forment qu'une poussière confondue avec les granulations du plasma". As I shall show, both these suppositions are wrong. The large vegetative forms of *Arachnula* are, in reality, multinucleate: but the nuclei are so small, and are often so obscured by food masses in various stages of digestion, that this can only be discovered by a very careful study of living and well fixed and stained organisms. In describing the chief cytological features, I shall — for the sake of brevity — confine myself to a mere record of the facts which I have been able to establish.

The structure of the cytoplasm and its contained nuclei can best be studied in small animals which contain little or no food. Such a form is depicted in fig. 1 (plate 23). The ectoplasm and pseudopodia appear homogeneous und structureless. The endoplasm, on the other hand, shows a distinctly alveolar structure, which is very clearly seen in the living protoplasm of actively moving individuals, and is not merely the result of fixation. When a small

¹⁾ In fixed and stained organisms.

organism is creeping on a slide or coverglass, it spreads itself out into so thin and delicate a film that it has an appearance which I can only compare with lace: it is like a living web of gossamer.¹⁾ The meshes of the protoplasmic network are not of equal size, and they change in shape and dimensions with the movements of the animal. Numerous refringent granules can be seen in the walls of the alveoli. They vary in size, but are mostly of extreme minuteness. Many of them stain deeply with chromatin stains, and for this reason — and for another which will be apparent when I have described other stages in the life-cycle — I shall call them chromidia. The chromidia, then, lie in the walls of the cytoplasmic alveoli and consequently present in their entirety a reticulate arrangement. (See figs. 1 [plate 23] and 21 [plate 24].)

The nuclei are minute vesicular structures (fig. 1 [plate 23] and fig. 21 [plate 24]). They vary somewhat in size, even in the same individual. I have made a large number of measurements of them in individuals fixed and stained in different ways; and I find their average diameter to be approximately $1,6 \mu$. They vary, however, from less than 1μ to almost 2μ : and they appear very slightly smaller after fixation with SCHAUDINN's sublimate-alcohol than after fixation with FLEMMING's fluid.

The structure of the nuclei, as seen in fixed and stained specimens examined with critical illumination under a ZEISS 2 mm. apochromatic oil-immersion (N. A. = 1,40), is shown in fig. 21 (plate 24). They are seen to be vesicular bodies with a central karyosome and with a very thin peripheral layer of chromatin in the form of minute granules. Faint strands of a lightly-staining substance can, with careful observation, be seen radiating from the karyosome to the periphery, or forming an indistinct network. The karyosome itself usually appears to consist of a single minute chromatin granule, but on account of its very small size it is difficult — if not impossible — always to be certain of this. Outside the peripheral layer of chromatin granules, the nucleus is probably bounded by a very thin achromatic membrane. But here again I cannot speak with complete confidence on account of the small size of the nuclei. The appearance of an achromatic membrane, which I have at times

¹⁾ CIENKOWSKI certainly chose a very apt name for this organism. I should perhaps point out, however, that when I compare the protoplasm with a piece of lace, the comparison must not be taken too literally. This is merely the optical appearance of a thin sheet of the protoplasm which is really alveolar and not reticulate, and which of course has no real holes — like those in lace — in it.

seen very clearly, may be merely an optical phenomenon: for even with the most careful adjustment of microscope and illumination, the appearance of a bright halo can often be produced round a minute brightly-illuminated object.

The structure of the nuclei of *Arachnula* appears to me to be closely similar to that of the nuclei of certain large multinucleate specimens of an *Amoeba* of the *proteus* group which I have several times studied.¹⁾ In these organisms, the nuclei are very large, and every detail of their structure can be clearly made out. For the sake of comparison, I have figured a single nucleus from one such organism (fig. 23, plate 24), after staining in the same way as the nuclei of *Arachnula* shown in fig. 21. It will be seen that there is a central karyosome-like mass of chromatin granules, from which achromatic threads radiate to the peripheral layer of chromatin. Outside this the whole nucleus is enclosed by a fairly thick achromatic membrane.

All the nuclei of *Arachnula* appear to me to possess the same structure. Variations from the type which I have described appear to be referable in all cases to differences in treatment in the process of fixing and staining. All well fixed and stained nuclei appear to me alike.

In small specimens of *Arachnula* the nuclei may be very few, but in large specimens they are very numerous. I have counted nearly a hundred in some of these, but probably more were present. Large and active organisms are generally filled with food, which makes it always difficult and often impossible to count their nuclei. The very small specimen shown in fig. 18 (plate 24) has 3 nuclei: that in fig. 19 has 32: that in fig. 1 (plate 23) has 12: and in the very large form shown in fig. 2, between 70 and 80 nuclei could be counted, though probably many more were present. These numbers may be taken as fairly typical.

The nuclei may be found in any part of the endoplasm, but they are nearly always grouped near to one another. It is very

¹⁾ These amoebae occur in fresh water, and in the uninucleate condition would probably be called, "*Amoeba proteus*". The nucleus at this stage is very large. The amoebae become multinucleate in a manner which I have not been able to make out. They finally contain two or three dozen nuclei of very small size, and closely similar to the nuclei of *Arachnula*. As the nuclei increase in numbers, they decrease in size, but all through their development they possess the same characteristic structure. The rest of the life-cycle of this form is still unknown to me.

unusual to find them distributed all through the body of the animal, or to find one nucleus at any great distance from its fellows. (Compare fig. 1.)

In organisms which are filled with food in various stages of digestion, the endoplasm presents appearances very different from those which I have just described. These will be noted later. (See below, p. 328.) I will now give a few particulars concerning the movements of *Arachnula*.

Movements, etc.

All the movements of *Arachnula* are accompanied by a profuse secretion of slime. It will therefore be convenient to describe the two phenomena together.

The animal moves very actively as a rule — as CIENKOWSKI noticed. Its flowing protoplasm often appears to hurry from place to place, so that it merits the specific name which he gave it. But like all amoeboid organisms, *Arachnula* comes to rest at times, and I have more than once seen an individual remain almost motionless for several hours.

The mobile, liquid body of an *Arachnula* leaves a track of slime behind it as it moves across a slide or coverglass. In the fresh and unstained condition, this track is at first almost invisible: but after a time it becomes easily distinguishable, because numerous bacteria and other micro-organisms get entangled in it. In fixed and stained preparations, the places over which an organism has passed are very clearly seen. Large areas of the coverglass may be seen smeared and streaked with slime: and here and there, where an organism has rested for a time, an irregular reticulate area of slime and foreign bodies shows — almost like a photographic print — the characteristic outline of an *Arachnula*. The pseudopodia are specially concerned in the production of slime, and leave very characteristic "footprints". The pseudopodia are thrown out as extremely long and fine threads. Their terminations are often so excessively fine, indeed, that they become invisible — even in stained specimens. In the proximal part of a long pseudopodium, the streaming of the protoplasm can be clearly seen. When the pseudopodium is withdrawn a very curious phenomenon is presented. The protoplasm flows back into the body, but appears to do so only in part. As the animal moves away, it seems to leave the greater part of the pseudopodial thread behind it. And one thus obtains the impression that the organism is throwing off its pseudopodia, and leaving them

behind as it moves from place to place. I have no doubt, however, that this peculiar phenomenon is due to the following sequence of events. As the pseudopodium is pushed out, it is invested with a thick coating of slime, which adheres to the solid object on which the animal rests. When the protoplasm of the thread is withdrawn, the slimy investment is left behind. On account of its very small size and feeble refringence, however, it is impossible to see how much of the apparent pseudopodium is living protoplasm and how much is slime.

No detailed description of the movements of *Arachnula* need be given. They have already been described with sufficient accuracy by CIENKOWSKI. I have already mentioned the remarkable changes of form undergone by the organism in the course of its movements, and would only add here the following points. In large organisms, the body moves with less uniformity than is the case with small organisms. One may often see different parts of the body moving in very different ways: one part may be catching and ingesting food, another part may be tentatively throwing out pseudopodia, another part may be completely at rest. The body is often nearly severed into several apparently almost independent parts, and has the appearance of being several loosely connected organisms rather than one organism. At such a time, the animal has a particularly disorganized appearance, and the movements of its various parts seem altogether inco-ordinate. But a little later the parts may be seen to flow together as a whole, whose actions appear — to me, at least — quite co-ordinate and unanimous. I have obtained the impression that most — if not all — of the movements of this animal are concerned with the quest of food. It is a voracious feeder, and I will now record my observations on its mode of nutrition.

Nutrition.

Arachnula feeds exclusively — so far as I have been able to ascertain — upon other protista. The specimens which I have studied nourished themselves chiefly upon diatoms (various species of naviculoids), Cyanophyceae (especially small *Oscillatoriae*), flagellates (especially *Chlamydomonas* and *Monas* spp.) desmids (*Closterium*), ciliates (especially small vorticellids), and bacteria. They seem to have a special fondness for the first three of these.

The method of nutrition is curious, and appears to be peculiar to this organism and *Vampyrella*. It has been, to some extent,

observed already by CIENKOWSKI in both forms, but appears to have escaped subsequent observers. I shall therefore describe it in detail.

Food is captured and ingested in the manner characteristic of amoeboid organisms. (As this has been so fully studied in *Amoeba*, etc. by RHUMBLER, JENNINGS, and others, I will say no more about it here.) The animal continues to ingest food until it is gorged and presents a bloated appearance. During this time the food appears to be digested but little. Finally the organism becomes so heavy with food that its movements become extremely sluggish, and ultimately cease. It then rounds itself off into a globular mass, with the food densely massed in the middle. A cyst is then secreted round the whole, and within this the animal digests its food as far as possible. When digestion is complete, the *Arachnula* emerges from the cyst and creeps away; leaving behind, as it does so, the cyst wall enclosing an undigested faecal residue. I shall call such a cyst a "digestive cyst" ("Verdauungscyste", CIENKOWSKI) to distinguish it from another kind of cyst to be described later.

To illustrate the foregoing phenomena, I have selected and drawn a series of stages from organisms which were feeding chiefly upon diatoms. (See figs. 3—8, plate 23.) Fig. 3 shows a small organism filled with five relatively very large diatoms, and a number of very small food-particles of various sorts. The organism at this stage is still motile. During encystation, the protoplasm flows about in such a way that the ingested diatoms become arranged in a very definite manner with their long axes parallel to one another. The cyst itself is at first a clear covering of slime, similar to that secreted during progression. It is very sticky, and soon entangles many bacteria and other foreign bodies, so that as it hardens it usually appears heavily incrustated. The digestive cyst in fig. 4 is lightly stained, and is seen in optical section. The arrangement of the mass of diatoms is clearly seen. They occupy a central position, and are surrounded by the thin protoplasmic layer of the *Arachnula* itself, in which a number of nuclei can be seen. The whole is surrounded by the incrustated cyst.

The size of the cysts varies considerably, their length being from about 15 μ to 40 μ . Their outline is generally circular, oval, or elliptical. Large cysts may contain about three dozen diatoms (the numbers are often very difficult to count), and the protoplasmic layer surrounding them is frequently of extreme tenuity. In newly encysted animals the protoplasm is filled with granules, and stains very

deeply. The nuclei can be made out only with difficulty — sometimes not at all. When digestion is far advanced, the structure of the protoplasm becomes much clearer. The food-substances are assimilated, and the typical structure of nuclei, cytoplasm, and chromidia (already described, p. 322) can be distinctly seen (fig. 6). At this stage, only the shells of the diatoms and a few small undigested particles are left. Shortly after this, the *Arachnula* makes a hole in the cyst wall, and flows out (fig. 7). Its protoplasm is now quite free from food-bodies, but contains a good deal of chromidial substance. Its nuclei and contractile vacuoles are clearly seen. As soon as it has escaped from the cyst, the *Arachnula* begins to search for food once more.

The time taken for the complete digestion of food inside a cyst is considerable. I cannot state exactly how long it is, but I believe it to be not less than two days. It is extremely difficult to keep the same cyst under observation for a long time on account of the active organisms which are invariably present in preparations. An active *Arachnula* will flow over an encysted organism,¹⁾ and drag it for a considerable distance — often right out of the field of the microscope. Oscillatorians also, gliding round and over a cyst, will displace it so that, if left, it cannot be found subsequently. The time can therefore be determined only by continuous observation of the same cyst for several days.

Cultures of *Arachnula* which have been kept for some time are often full of the remains of digestive cysts, such as that shown in fig. 8. If coverglasses are left lying on the bottom of a culture-dish for some time, they will often be so thickly strewn with these faecal residues that almost the whole surface of the glass is covered. In places, the cysts adhere to one another so closely that they form a sort of membrane coating the coverglass. They have a remarkable and characteristic appearance, owing to the regular way in which the empty diatom shells are arranged in packets — reminding one somewhat of bundles of cigars.

I have so far considered the appearances presented by *Arachnulae* which eat diatoms chiefly; but other food is treated in exactly the same way — the undigested remains left in the cysts depending, of course, on the nature of the food. It will be unnecessary to give a further description of this.

¹⁾ So far as I have been able to ascertain, an active *Arachnula* never eats an encysted one. Some *Amoebae* certainly do this; but in *Arachnula*, the cysts appear to be merely jostled about unintentionally by active animals.

I have already alluded to the remarkable appearance of the protoplasm in an organism which is filled with food — that is, before it encysts. Fig. 22 (pl. 24) will convey some idea of this (compare with fig. 21). It is often quite impossible to make out anything of the internal structure of an *Arachnula* when it is glutted with food. Its nuclei are squeezed out of shape by the food masses, and its cytoplasm generally stains very deeply. It contains many lumps and granules of chromatin, which appear to be its own chromidia in part, and in part granules derived from the nuclei of ingested and half-digested organisms.¹) It is impossible to distinguish between these. The cytoplasm also contains at times a variable quantity of deeply staining granules of different sizes. From the few experiments which I have been able to make on these, I believe them to be metachromatic granules (“volutin”) derived from the diatoms, bacteria, cyanophyceae and other plants which *Arachnula* eats. (Concerning these granules cf. DOBELL 1911, 1912, etc.) I can find no evidence to show that *Arachnula* itself can manufacture or store “volutin”.

I have already had occasion to notice the fact that *Arachnula* is frequently coloured red or pink, and that the colour is dependent on the food. CIENKOWSKI (1876) long ago observed that *Vampyrella* became red when it fed on green algae — the chlorophyll being converted very rapidly into a red substance. On the other hand, he found that organisms feeding exclusively upon diatoms were colourless. The same is true of *Arachnula*: those individuals which feed on chlorophyll-containing organisms (*Closterium*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, etc.) acquire a red or pink colour; whilst those which feed upon organisms not containing chlorophyll (diatoms, protozoa, bacteria, etc.) remain colourless.²) The colouring matter when present is partly in the form of tiny granules, but it is largely in a state of solution, apparently, in the living protoplasm, which appears unevenly stained.

CIENKOWSKI'S description of *Arachnula* as “farblos” is therefore only partly true. Many individuals are colourless, but many are coloured, the colour being intimately connected with metabolism. The colour does not belong to the organism itself, but is derived from its food.

¹) These may be compared with the “chromidia” of *Chromidina* (DOBELL 1908).

²) *Arachnulae* which feed upon diatoms are sometimes of a slightly brownish colour, due apparently to diatomin derived from the chromatophores of these organisms.

PENARD (1903) says that his organisms were filled with extremely small bluish granules, but food-bodies were "extremely rare" in the protoplasm. The bluish appearance of the granules was possibly due to the optical apparatus which he employed. But the absence of food-bodies in such greedy organisms, though it might at first sight seem unaccountable, is probably due merely to the fact that there was nothing in PENARD'S moss-infusion which they could devour. They were probably suffering from starvation.

There is one other point worthy of mention in connexion with the digestive cysts of *Arachnula*. This is the fact that an organism may sometimes divide into two inside such a cyst before emerging. Two individuals therefore come out of a cyst formed originally by one only. This is by no means common. I have only a few cysts in my preparations in which the protoplasm is divided — one of these being depicted in fig. 5, pl. 23. I have not been able to study this method of multiplication in detail. It appears to me that the nuclei of the original animal are distributed in about equal numbers to the two daughter-individuals: but details of the process are extremely difficult to make out, on account of the food-residues present in the cysts in all cases.

This phenomenon is of interest in another way. CIENKOWSKI (1876) has described the formation of digestive cysts by *Arachnula* and also by *Vampyrella* — the cysts being closely similar in both cases to those which I have just described. In the case of *Vampyrella vorax*, he found that the encysted organism usually divided into two before emerging, though this was stated not to occur in *Arachnula*. But as I have already said, such a division does take place occasionally in the latter organism, so that there is here a further point of resemblance between the two forms. CIENKOWSKI'S figures of *V. vorax* (1876, figs. 15, 16, 17) are, indeed, almost exactly like what I have seen in *Arachnula*.

Division inside a digestive cyst is not the usual method of multiplication which I have observed in *Arachnula*. The common method of reproduction will now be described.

Encystation and Reproduction.

For a long time I was quite unable to discover how reproduction is effected in *Arachnula*. I found that the organisms increased in numbers in my cultures, but I was unable to find any dividing forms. I could find individuals of all sizes — from very large forms

which might measure about 250 μ in length (when extended) down to very small forms of not more than about 10 μ . The large forms contained many nuclei, the small forms usually but few — though sometimes they were packed with very numerous nuclei. Yet no dividing nuclei were to be found. I examined many thousands, but all were exactly alike — save for a slight difference in size. The cysts were the only other stages in the life-cycle which I could discover. I thought it probable that the large, multinucleate animals divided into the small forms, but I could never obtain any direct evidence that this was so. I often saw a large animal divide almost completely into several pieces, the parts being connected by the finest strands of protoplasm — so fine, indeed, that it required the most careful observation to find them. But these forms never divided completely. Sooner or later, the connecting threads thickened, and the parts flowed together into one whole organism once more.

I now believe that division in this way never occurs, as I subsequently discovered the reproductive processes which take place in *Arachnula* by making a more careful study of the cysts — especially after fixation and staining. This part of the life-history is remarkable, so I shall describe it in detail.

There are, in reality, two different kinds of cyst formed by *Arachnula*. The first of these is the digestive cyst, which I have already described: the second is what I shall call a reproductive cyst. In the fresh state these may be easily mistaken for one another, though they are totally different as regards their development. The changes which take place inside the reproductive cysts are extremely difficult to make out. They can be followed only by devoting the greatest care to fixation, staining, and microscopical technique in general — the correct adjustment of the microscope being by no means unimportant. The methods which I have employed in making the figures are given in the description of the plates: I would only add that I have controlled all my results by other methods of fixation and staining, and — whenever practicable — by observation of the living organisms. I may say that I know of no more difficult object for microscopical investigation than *Arachnula*, nor one which is more likely to be wrongly interpreted by a not too careful investigator. If others subsequently undertake to study this organism, they will easily be able to convince themselves of the truth of these remarks. The following account of the development of the reproductive cysts is, to the best of my belief, substantially correct, and as objective as I am able

to make it. Nevertheless, that I may have erred in some particulars I realize better, probably, than anybody else can who has not made a critical study of the same object.

A young reproductive cyst formed by an *Arachnula* is very similar, both in size and appearance, to a digestive cyst. As a rule, it is a round or ovoid body with a diameter of about $15\ \mu$ to $35\ \mu$ — rarely more. I believe that large individuals form several cysts, after previously breaking up into several pieces; but I have never been able to observe this in the living animal, and base my supposition upon appearances which I have seen in fixed and stained preparations. Small individuals, however, encyst without any division taking place — the cyst being formed in the same way as a digestive cyst.

Even from a very early stage the reproductive cysts are distinguished by one feature of note — they have no food-bodies inside them. An organism which is about to encyst possesses perfectly clear protoplasm, without any inclusions whatsoever. All food-bodies have been digested, and the indigestible residues have been eliminated. By carefully staining these stages, it can be seen, moreover, that the chromidia also have disappeared (fig. 9 pl. 24). The nuclei are unchanged — displaying their characteristic form with great clearness, on account of the absence of chromidia and foreign bodies from the cytoplasm (fig. 9). Whether the chromidia are absorbed or cast out of the organism, I have been unable to determine. Another characteristic of these forms is the manner in which the nuclei and contractile vacuoles are distributed. The nuclei are scattered more or less evenly through the body, but are absent from the peripheral region: here the contractile vacuoles are all situated — there being none, at this stage, in the central part of the organism (fig. 9).

The organism now secretes its cyst, which is at first very hyaline and thin, but subsequently becomes thick and much incrustated on the outer side. When first formed, the cyst appears to be soft and sticky. Later, it appears to have a gelatinous consistency, and becomes slightly yellowish; though it never becomes dark-coloured and hard, but remains transparent during all the ensuing stages of development of the organism inside. Fig. 10 shows a stage at which the cyst is fully formed. It might be supposed that the changes which take place inside the cyst would be easily observable on account of the transparency of the cyst itself. Unfortunately, this is not so: for the organisms are in the habit of crawling into the

densest part of the vegetation in their culture before they encyst, and they soon become coated with débris and foreign bodies of all sorts. It is often quite difficult even to find the cysts in the fresh state. After staining, however, the cysts can be studied with greater ease: but even then, the overlying particles (diatom shells, bacterial zooglaea, cyanophyceous filaments, etc.) are frequently a source of great trouble and annoyance. In all my figures, I have shown the cysts in optical section, and have omitted the surrounding débris which was invariably present.

Whilst the cyst is in process of formation, a change takes place inside the organism. A large vacuole, which persists during all subsequent stages, is gradually formed. It makes its first appearance as a few centrally situated non-contractile vacuoles, which fuse together to form one large central vacuole. When this is fully formed, the peripheral contractile vacuoles disappear completely (see figs. 10, 11).

Around the large central vacuole, the nuclei all group themselves (fig. 11): and, judging from the frequency of this stage in preparations of the cysts, the organism remains in this condition for a considerable time. At this stage another remarkable change occurs. Chromidia¹⁾ begin to make their appearance in the cytoplasm surrounding the nuclei — that is, in the cytoplasm at the periphery of the vacuole (fig. 11).

The chromidia are at first in the form of minute chromatin granules. They appear to be formed by the extrusion of chromatin from the nuclei into the cytoplasm, though I have not been able to observe this directly. Nevertheless, with the formation of the chromidia, the nuclei gradually become paler, until they are extremely difficult to see (fig. 12). At this stage, the nuclei are mostly very faintly stained bodies lying in a deeply stainable cytoplasm containing numerous extremely minute chromidial granules. The karyosomes of the nuclei can, however, be made out quite distinctly in many cases, (cf. fig. 12).

At a still later stage the nuclei disappear completely (fig. 13). The chromatin particles in the cytoplasm are hardly distinguishable. A few chromidial granules can be made out, but most of the chromatin is in such a fine state of division that the entire protoplasm

¹⁾ It is perhaps worth recalling here the somewhat similar changes which occur during encystation in some amoebae. In *Entamoeba ranarum* — as I have shown elsewhere (DOBELL 1909a) — a large vacuole is formed during encystation, and masses of chromidial substance are extruded from the nucleus into the cytoplasm.

filling the cyst is darkly stained and cloudy (fig. 13).¹⁾ The protoplasm at the periphery of the vacuole is usually the darkest part. It appears, therefore, that all the nuclei are resolved completely into chromidia.²⁾ I think it possible — though I cannot satisfy myself that this is so — that the larger granules of chromatin which can still be resolved by the microscope, are the karyosomes of the original nuclei. A few such chromidial granules may be found lying in the general haze of chromatin in all cysts at this stage.

The subsequent development of the cyst consists in the segmentation and liberation of its contents. The large vacuole becomes still larger. Its outline becomes very irregular, owing to the formation of radial extensions into the protoplasm. The latter simultaneously becomes much vacuolated, presenting an irregular reticulate appearance in optical section (fig. 14). Here and there, the protoplasm becomes aggregated into deeply staining, somewhat stellate masses separated from one another by the vacuoles (cf. fig. 14). Most of the chromidial substance is concentrated in these areas — the larger granules being confined exclusively to them.

The vacuolation of the protoplasm and its differentiation in this manner continue until almost complete segmentation of the contents of the cyst has occurred. At this stage, the cyst wall ruptures, and the incompletely-segmented masses of protoplasm containing chromidia flow out (fig. 15). As far as I can determine, they emerge one at a time, and are constricted off from the rest of the protoplasm as they emerge. My observations on the living organisms are, unfortunately, very incomplete at this stage, — owing to difficulties of observation to which I have already referred. It seems clear, however, that the small individuals which escape in this manner are derived from the stellate areas of protoplasm which were present at an earlier stage inside the cyst. It is certain, also, that the whole of the protoplasmic contents does not segment into a brood of young individuals. A small quantity is left behind as a cystic residue, and ultimately dies and breaks up.

The brood of young *Arachnulae*, which leave the parent cyst

¹⁾ In the lithographic reproduction of this drawing the granules are shown too distinctly.

²⁾ I have, of course, entertained the view — in self-criticism — that these appearances were due merely to bad technique. I have satisfied myself, however, that my fixation and staining were not at fault. I have also devoted many hours to the examination of these stages by critical illumination with monochromatic light. I am convinced that the above is a correct account as far as it goes.

in this manner, consists of about ten to twenty extremely small, colourless individuals. In the living condition they are very transparent, and difficult to observe. They move rather slowly by putting out long, slender, thread-like pseudopodia (fig. 16). A few granules of very small size can be seen in the living organisms. These granules stain deeply with chromatin stains, and constitute the sole nuclear apparatus possessed by the youngest organisms. In none of them have I ever been able to find vesicular nuclei like those present in large *Arachnulae*. I have subjected these minute forms to such prolonged and careful scrutiny that I feel sure I should have found such nuclei if they had been present.

The very young individuals, containing chromidia but no vesicular nuclei, possess a distinctly alveolar protoplasm like that of the larger forms; but no contractile vacuoles can be seen in them (see fig. 16). They move about, but I have never seen them capture any food and no food bodies can be seen inside them. Yet they become larger, and their chromidia become larger and more definite (fig. 17). The latter consist of a few distinct granules of chromatin lying in the protoplasm, together with numerous very small and somewhat indistinct and irregularly scattered particles. These chromidia are confined to the endoplasmic region of the organism.

Individuals which have attained a somewhat larger size are characterized by the possession of several quite typical vesicular nuclei like those present in large *Arachnulae* (fig. 18). I was for some time unable to discover how these nuclei originated, for there appeared to be no organisms intermediate between those containing fully-formed vesicular nuclei, and those containing chromidia only. Of the former, also, some contained only one, two, or three nuclei: whilst others, but slightly larger, contained two or three dozen. But the most careful search failed to reveal any nuclei in process of division. I observed, however, that many of the nuclei were extremely small — being less than $1\ \mu$ in diameter, though otherwise exactly like the nuclei of the adult animal (cf. figs. 18, 19).

As a result of a very careful study of many individuals in these early stages of development, I have reached the conclusion that the vesicular nuclei are formed by the growth and differentiation of the chromidia. All the new nuclei are formed in this way. The vesicular nuclei themselves do not divide. I may say that it has taken me a long time to convince myself of the correctness of this interpretation. I have always regarded "chromidia" with great scepticism — and not without just cause: for I know

from my own work that a great deal of what has been written about "chromidia" is founded upon faulty technique and errors of observation and interpretation.

The formation of vesicular nuclei is most clearly seen in young organisms which contain two or three fully-formed vesicular nuclei in addition to their chromidia. If such an organism be subjected to a very careful scrutiny, appearances such as those shown in fig. 20 may be seen. This figure is drawn from a part of a small organism which contained three obvious vesicular nuclei, of the typical size and shape when seen under a magnification of about 1000 diameters. Under a magnification of over 2000 diameters, however, — with suitable illumination, etc. — further detail may be resolved in the chromidial structures. In the first place, there are numerous excessively small granules of chromatin (fig. 20) in which no structure of any sort can be made out. There are other larger granules also, which, as they increase in size, show a clear space inside them — indicating that they are becoming vesicular. These structures have a diameter of approximately $0,25 \mu$ to $0,5 \mu$. In still larger vesicles — of about $0,75 \mu$ to 1μ diameter — a tiny granule can be made out in the centre. This granule is the karyosome, which cannot be distinguished in earlier stages. (Such a stage is seen on the right of the large vesicular nucleus in fig. 20.) These bodies now possess all the features characteristic of the large fully-formed nuclei, with the exception of their size. But all stages between the large and small nuclei may be found, and it seems obvious that the small become large by growth — without any further transformation.

In this manner, the small chromidial *Arachnulae* develop numerous nuclei, which are often quite closely packed together (fig. 19). The growth of the cytoplasm¹⁾ appears to take place subsequently, without any considerable increase in the number of nuclei. During these later stages, however the animals begin to fill themselves with food, so that the behaviour of the chromidia cannot be followed with precision. Chromidia are present in the large vegetative individuals — as we have already seen — but whether they continue to give rise to new vesicular nuclei throughout the whole life of the organism, I have been quite unable to determine. It is always

¹⁾ I believe that the large *Arachnulae* result from the growth of the smaller forms. It is possible, however, that large forms may arise by the fusion of smaller forms — as is stated to occur in "*Nuclearia*" (= *Arachnula*?) by ARTARI (1889). I have found no evidence to support such a view.

difficult and frequently impossible to distinguish between chromidia and ingested bodies — if, indeed, any such distinction exists in reality in the large forms. I am not at all certain that the “chromidia” of the large organisms are the same structures as the “chromidia” of the small animals which escape from a reproductive cyst. There are, at present, insurmountable difficulties in the way to any definite conclusion regarding this matter.

I have studied many individuals in which vesicular nuclei appear to be forming from chromidia in the manner just described. The appearances seem to me to admit of no other interpretation. I am not sure, however, whether the chromidial granules really become differentiated and grow into vesicular nuclei. This is merely the appearance which presents itself in preparations. It is quite possible that the apparent “granules” or “chromidia” really possess all the structures of the fully-formed “nuclei” — that they are, in fact, vesicular nuclei of such excessively small size that they appear as mere granules under the highest powers of the microscope. The transformations undergone by the nuclei and chromidia are all presented to the observer on such an exceedingly small scale, that only those unacquainted with the limitations of the microscope would dare to dogmatize about them. It should be remembered that the diameter of the “large” vesicular nuclei is only 1,6 μ .

I shall return to the consideration of the nuclear phenomena in *Arachnula* in a later section (see p. 345), and I shall not attempt, at this point, to compare my observations with those of others on other organisms. There is, however, one point in connexion with the life-cycle which may be mentioned here. On analogy with the results of SWARCZEWSKY (1909) and POPOFF (1911), it might be supposed that the small chromidial forms of *Arachnula* are really gametes. This idea had, of course, occurred to me when I was studying these forms. I may say, however, that I have made no observations which would support such a supposition in the slightest degree. Nevertheless, there is at present no proof that the chromidial forms are not gametes. The observations which I have been able to make lead me to believe that the interpretation of these forms which I have already indicated is probably the correct one — the interpretation, namely, that the chromidial forms are asexually produced young, which acquire vesicular nuclei and grow into the adult form without any sexual process taking place. If sexual reproduction occurs in the life-history of *Arachnula*, it has yet to be discovered.

Part II.

There are many points connected with *Arachnula* and its life-history which still remain to be discussed. I shall consider the more important of these under the several headings of this second part.

Nomenclature.

The naming of the organism which has been described in the first part of this paper is no easy matter. This is due to the fact that "*Arachnula*" and its allies have usually been studied in a haphazard manner, — isolated specimens or stages in the life-cycle having been observed, for the most part, and numerous worthless genera and species founded upon them. I have carefully sifted most of the literature which seems to me to bear upon the present form; and I will — in the following paragraphs — confine myself for the sake of brevity to a bare statement of the conclusions which I have come to. To discuss this problem in full would take up too much space, and would not, in any case, lead to any definite result. I will not weary the reader with detail.

It is quite clear to me, from CIENKOWSKI'S original descriptions of *Vampyrella*, that this genus can hardly be separated from *Arachnula*. CIENKOWSKI (1865, 1876), however, regarded the two genera as distinct. Nevertheless, the only points which distinguish *Arachnula* — so far as I can gather from his papers — are 1. the possession of contractile vacuoles, 2. the character of the pseudopodia, 3. absence of colour. From my study of *Arachnula*, it appears that the pseudopodia and colour afford no criteria — for they may be identical in both forms at certain times. Concerning the presence or absence of contractile vacuoles, I would point out that such a character can hardly be used to distinguish even species from one another — much less genera. For there is evidence to show that the same organism may or may not possess these organs according to the environment in which it finds itself (cf. ZUELZER 1910).¹⁾ In *Arachnula* itself, they are usually present (in freshwater forms) but occasionally absent — at all events for a considerable period. Moreover, according to some authors, *Vampyrella* may possess vacuoles

¹⁾ It was found that *Amoeba verrucosa* could live in sea water: but in this medium it possesses no contractile vacuole. It is interesting to note that the "*Biomyxa vagans*" of MOEBIUS (1888), which was probably *Arachnula*, and which was found in sea-water, possessed no contractile vacuoles likewise.

(e. g. ZOPF 1885, DOFLEIN 1911). The real difficulty in the way of deciding whether or no *Arachnula* and *Vampyrella* are synonyms lies in the fact that nobody has yet worked out the structure and life-history of the latter in sufficient detail for comparison between the two to be possible. As I have not been able to study *Vampyrella* in any detail myself, and as CIENKOWSKI was familiar with these organisms and distinguished them from his *Arachnula*, I think it best to preserve both his genera for the present. I incline to the view, however, that *Arachnula* should be placed in the genus *Vampyrella*. Minor distinctions between the two (as regards habits, etc.) cannot decide the point, which is a question of morphology.

HERTWIG and LESSER in 1874 described two organisms which they placed in a new genus *Leptophrys* (*L. cinerea* and *L. elegans*). I should say that both these "species" are the same, and are merely forms of *Arachnula impatiens*. But CIENKOWSKI¹⁾ (1876), expresses the opinion that "*Leptophrys*" is *Vampyrella vorax*, so that I must leave the question of synonymy open in this case also.

In 1865 CIENKOWSKI described two organisms for which he founded the genus *Nuclearia*. So far as I can judge, these should certainly be placed in the same genus as *Arachnula*, and they are probably merely stages in the life-history of *A. impatiens* — at all events in part. This applies also to the organisms called "*Nuclearia*" by several subsequent authors (FRENZEL 1897, CASH and HOPKINSON 1905, etc. etc.). Considerable support for this view is to be obtained from the observations of ARTARI (1889).²⁾ It is probable, however, that stages in the life-histories of other rhizopods have also been identified as "*Nuclearia*". There is, for example, a "*Nuclearia*-stage" in the life-history of *Arcella* (SWARCZEWSKY 1908, and others). It is possible, also, that there is an independent form to which this name belongs. I must therefore place *Nuclearia* CIENK. (pro parte) merely as a probable synonym of *Arachnula*. Furthermore, the genera *Nuclearina*, *Nuclearella*, and *Vampyrina* introduced by FRENZEL in 1897 are not founded on observations or characters which are sufficient to distinguish them from *Nuclearia*. These three names also, therefore, may possibly have been given to stages in the life-history of *Arachnula*.

¹⁾ He wrongly calls *L. cinerea* by the name *L. cinerascens* throughout his paper.

²⁾ See, for example, his observations on the colours of these organisms, on the "plasmodia" formed by them, on their nuclei, etc.

There is another genus — *Gringa* — founded by FRENZEL (1897) for three different "species". Any or all of these may have been really *Arachnula*. It is impossible to decide from the available evidence.

CIENKOWSKI himself (1876) described and figured what he called a "freshwater plasmodium". I am not at all certain whether this was really an *Arachnula*. I think it probably was — though possibly a different species from *impatiens*. The same may be said, moreover, of a number of similar organisms described by various authors under the name *Biomyxa*. This genus was proposed by LEIDY in 1875, and the organisms described and figured in some detail in 1879. LEIDY'S form (*B. vagans*) appears to differ in some particulars from *A. impatiens*, and I think it probably a member of the same genus but a different species. "*Biomyxa vagans*" described subsequently by GRUBER (1884) may have been the form studied by LEIDY, or may have been *A. impatiens*. But it seems to me¹⁾ almost certain that the "*B. vagans*" described a little later by MOEBIUS (1888) was CIENKOWSKI'S *Arachnula*. GRUBER, it may be noted, believed that his "*Biomyxa*" was the same as MAX SCHULTZE'S "*Amoeba porrecta*" (SCHULTZE 1854). From the descriptions of these two forms it is impossible to be certain whether this is so or not.

PENARD (1903) appears to be the only recent writer who has identified *Arachnula impatiens*. He has, however, described a new species (*A. vesiculata* PENARD 1905) which — so far as I can judge — is most probably not an *Arachnula* but a heliozoon. Sufficient information is not given, however, for me to form a more definite opinion.

The very large marine rhizopod described as *Pontomyxa* by TOPSENT in 1893 appears to be a form closely related to *Arachnula*. From the fragments of its life-history which have been recorded, it seems to me to be a large species belonging to the same genus as *Arachnula*.

Quite recently SCHEPOTIEFF (1912) has published an account of his investigations of some of the „Monera" of HAECKEL. From this work it appears to me almost certain that some of the large organisms which HAECKEL called "*Protogenes*" are really very closely related to *Arachnula*. The account of "*Protogenes primordialis*" HAECKEL shows many points of similarity, in its development, to *Arachnula*. "*Protogenes roseus*" TRINCHESE is, however, even more

¹⁾ RHUMBLER (1904) also regards *B. vagans* MOEBIUS (non LEIDY) as a synonym of *A. impatiens*.

closely comparable with the *Arachnula* which I have studied, and should probably be referred to the same genus. It is, as SCHEPOTIEFF says, probably "a marine, multinucleate Vampyrellid". Unfortunately, SCHEPOTIEFF's descriptions of these organisms are incomplete, and illustrated by figures which are often very diagrammatic: nor is it possible, in some cases, to judge of the correctness of his statements, as the evidence upon which they are based is not revealed. This worker has also — most unfortunately — proposed new names for some of the organisms which he has studied.¹⁾ If SCHEPOTIEFF's organisms are really the same as those originally studied by HAECKEL — and I do not think it is possible to prove this — then it appears probable that *Protogenes* HAECKEL is, in part, synonymous with *Arachnula*.

Penardia CASH (1904) appears to be a form related to *Arachnula*, but how closely I cannot determine from the published accounts. There is, at all events, no justification for making it a type of a new genus. In the monograph of CASH and HOPKINSON (1905) several similar rhizopods are described. But the descriptions, and the classification based on them, are almost valueless:²⁾ for no study was made of the cytology, life-history, or anything else of importance in these organisms. Whether any or all of these rhizopods are forms of *Arachnula* it is impossible to determine. It is obviously profitless to discuss work of this sort.

Assuming that the organism whose life-history I have partly described in the earlier part of this paper is identical with CIENKOWSKI's *Arachnula impatiens* — as I see every reason to believe

¹⁾ SCHEPOTIEFF proposes to call "*Protogenes primordialis*" by the new name "*Haeckelina radiosa*" and to substitute the name *Vampyrelloides* (nov.) for "*Protogenes roseus*". It should be pointed out, however, that such a course is impossible, and indeed the only real reason which SCHEPOTIEFF advances for making the change is that HAECKEL's names — literally interpreted — are unsuitable designations for these organisms. In this I fully agree with him, but names cannot be changed for such a reason. As SCHEPOTIEFF himself is aware, *Haeckelina* has already been used by BESSELS (1875) for a foraminiferan, and by MERESCHKOWSKY (1879) for a heliozoon. And as BÜTSCHLI (1880) has pointed out, *Haeckelina* BESSELS is a synonym of *Astrorhiza* SANDAHL 1857, and must therefore be eliminated.

²⁾ I may cite, as an instance, the following. Several similar forms are classified thus into two families — Vampyrellida (including *Vampyrella*, *Hyalodiscus*, *Nuclearia*, and *Chercherina*), and Reticulosa (including *Gymnophrys*, *Biomyxa*, *Penardia*, and *Chlamydomyxa*). The definitions, however, of *Vampyrella* and *Nuclearia* (pp. 94, 95) and of *Gymnophrys*, *Biomyxa*, and *Penardia* (p. 85) might all of them be equally well applied to certain stages of the organism which I call *Arachnula*.

to be the case — I think it best, for the present, to preserve this name until such time as the life-cycles of *Vampyrella* and other similar forms are more fully investigated. The early work on *Vampyrella* naturally left much to be desired: and unfortunately more recent work (e. g. CASH [1905], HOOGENRAAD [1907], etc.) has added little to our knowledge.

The conclusions to which my study of the literature has led me are tabulated below: but I would emphasize the fact that these conclusions are to some extent mere guesses to which I attach but little importance. So many of the statements made about *Arachnula* and related forms are obviously based upon the most superficial observations, and so many others of them are worthless from a systematic point of view, that I do not think it will ever be possible to settle the problems connected with the nomenclature of these organisms in a satisfactory manner. I have taken into consideration only the more important publications which appear to me to have any bearing on the present problem: but there are many other scattered notes which may possibly apply to *Arachnula* in some of its stages. A discussion of these appears to me to be useless.

Arachnula impatiens CIENKOWSKI 1876.

Probable synonyms:

- Vampyrella* (spp.) CIENKOWSKI 1865, et auctt.
- Nuclearia* (spp. pro parte) CIENKOWSKI 1865, et auctt.
- Leptophrys cinerea* et *L. elegans* HERTWIG et LESSER 1874.
- Biomyxa vagans* (LEIDY) MOEBIUS 1888.
- Nuclearia delicatula* (CIENK.) ARTARI 1889.
- Arachnula impatiens* (CIENK.) PENARD 1903.

Possible synonyms:

- Amoeba porrecta* M. SCHULTZE 1854.
- "Süßwasser Plasmodium" CIENKOWSKI 1876.
- Biomyxa vagans* LEIDY 1875.
- Biomyxa vagans* (LEIDY) GRUBER 1884.
- Vampyrellidium* ZOPF 1885.
- Gringa* (spp.) FRENZEL 1897.
- Nuclearina* (spp. pro parte) FRENZEL 1897.
- Nuclearella* (pro parte) FRENZEL 1897.
- Vampyrina* FRENZEL 1897.

Further, the following genera are probable synonyms of
Arachnula CIENK.

Pontomyxa TOPSENT 1893.

Penardia CASH 1904.

Protogenes (HAECKEL) SCHEPOTIEFF 1912 (pro parte).

Haeckelina (BESSELS) SCHEPOTIEFF 1912.

Vampyrelloides SCHEPOTIEFF 1912.

I would point out once more that I believe *Arachnula* should properly be placed in the genus *Vampyrella*, though the life-history of the latter has not been studied with sufficient accuracy for this to be proved at present. If it ever is, there will then be a further problem in connexion with the specific name to be applied to the organism which I have studied: for some of the "species" of *Vampyrella* are possibly stages in the life-cycle of *Arachnula*.

In concluding this section, I may perhaps be permitted to express the hope — which, I fear, is not likely to be soon realized — that future workers who attempt systematic work on this extremely difficult group of Protozoa will at least devote some time to a study of the organisms themselves before they venture to draw any conclusions; that they will not lightly identify a few isolated stages in the life-cycle of some organism with similar random samplings of other organisms described by other workers; and that they will refrain from introducing new generic and specific names until they have been able to ascertain the morphology and life-histories — as far as possible — of the forms to which the names are to be given. I fear it may appear to be mere effrontery on my part to voice such views: but I am convinced that the progress of protistology would be more rapid if they had been, and were now, more widely appreciated.

Systematic position of *Arachnula*.

Workers upon *Arachnula* and allied forms have already expressed many different views regarding the place which they should occupy among other organisms. Most frequently, the forms in question have been classified as Rhizopods (*Reticulosa*) or Heliozoa.

CIENKOWSKI (1876) referred *Vampyrella*, *Arachnula*, and his "fresh-water plasmodium" (which he considered to be probably a mycetozoon) neither to the "Rhizopoda nuda" nor to the Heliozoa: but he placed them all under the heading "Mit Rhizopoden verwandte Organismen".

LEIDY (1879, p. 283) says of *Biomyxa*: "It has been a question with me whether to regard it as a true rhizopod or whether to view it as the plasmodium of a fungus" (i. e. a mycetozoon). He recognized its resemblance to CIENKOWSKI'S *Arachnula*, *Vampyrella*, and *Gymnophrys*, and to the *Leptophrys* of HERTWIG and LESSER. Nevertheless, in his systematic account, *Biomyxa* is placed with the Foraminifera.

BÜTSCHLI (1880—82) tentatively placed *Arachnula*, *Vampyrella*, and *Nuclearia* among the Heliozoa, — in the group Aphrothoraca HERTWIG.

By ZOPF (1885) *Vampyrella*, *Leptophrys*, etc. are placed in the group Monadina Azoosporae — the "Monadina" being regarded as "niedere Mycetozoen".

TOPSENT (1893) puts *Pontomyxa* with the "Amoebaeae Reticulosa". *Gringa* is placed by FRENZEL (1897) in an order Protamoebaeae (Rhizopods without nuclei — practically HAECKEL'S Monera). But he founds a new order — Helioamoebaeae — to contain *Vampyrella*, *Vampyrina*, *Nuclearia*, *Nuclearina*, and *Nuclearella*.

DELAGE and HÉROUARD (1896) had previously placed *Vampyrella* in the group "Proteomyxiae Azoosporida" (= Monadina Azoosporaeae ZOPF) — the Proteomyxiae consisting of "formes très inférieures à caractères négatifs". *Arachnula* and *Nuclearia* were placed, with some doubt, among the Heliozoa.

PENARD (1903) follows CIENKOWSKI in placing *Arachnula* near the Vampyrellidae — a family which he does not regard, however, as showing affinities with the Heliozoa. CASH and HOPKINSON (1905) put *Vampyrella* and *Nuclearia* in the family Vampyrellida: but they put *Biomyxa*, *Penardia*, and *Gymnophrys* in the family Reticulosa.

Arachnula, *Vampyrella*, and a number of other organisms (mostly but little known, and probably a very heterogeneous assemblage) are placed by HICKSON (1909) in LANKESTER'S group "Proteomyxa" DOFLEIN (1911), in a like manner, places *Vampyrella* in a group "Protomyxidea" under the heading "Anhang zu den Rhizopoden".

SCHEPOTIEFF (1912) places "*Protogenes*" *roseus* TRINCHESE in the family Vampyrellidae: and another species of "*Protogenes*" (*P. primordialis* HAECK.) — which in some respects resembles *Arachnula* — he places with the Rhizopoda Reticulosa.

To-day it is hardly necessary to insist that HAECKEL'S "Monera" and similar groups ("Protamoebaeae", "Proteomyxa", etc.) have no existence in nature — being mere scrap-heaps for a number of unrelated organisms whose only common feature was that they were

insufficiently studied and consequently misunderstood. Nobody, I think, will object to *Arachnula* and its allies being withdrawn from such company. From what I have been able to ascertain of the life-cycle of *Arachnula* it will, moreover, be obvious that the inclusion of this organism among the Mycetozoa or Heliozoa is no longer possible. Modern work on both these groups has shown that the organisms contained in them possess little in common with *Arachnula* as regards morphology and life-history.

It will be apparent, from what I have already written, that I regard *Arachnula* as a member of the family Vampyrellidae — as probably, indeed, a member of the genus *Vampyrella* itself. That *Arachnula* belongs to this family of Rhizopoda can hardly be disputed: but it still remains to ask where the Vampyrellidae should be placed in the rhizopod system. Of *Vampyrella* itself we still know the morphology too imperfectly to answer this question conclusively. In the case of *Arachnula*, however, and some of its allies ("*Protogenes roseus*, etc.) we now have something to go upon.

The development of *Arachnula* shows some striking resemblances to the development of *Amoeba minuta* POPOFF — one of the few amoeboid organisms of which the life-history is known with any completeness. The nuclear phenomena afford many interesting features for comparison. The same may be said of some of the shelled rhizopods. I would mention, in particular, the life-history of *Allogromia ovoidea* RHUMBL., recently studied by SWARCZEWSKY (1909). The formation of gametes by this organism resembles the formation of young *Arachnulæ* within a reproductive cyst. In the case of *Allogromia*, a multinucleate animal is said to withdraw into its shell. The nuclei then fragment into chromidia, and the protoplasm segments into a brood of small, amoeboid, chromidial forms (gametes) which are set free and creep about. The chromidia condense (?) to form a nucleus in each of these gametes, which subsequently fuse in pairs. The zygote grows, differentiates its nuclear apparatus, acquires a shell, and becomes an adult *Allogromia ovoidea*. The life-history of *Arcella* may also be referred to in this connexion (see ELPATIEWSKY [1907], SWARCZEWSKY [1908], etc.).

The gigantic, naked, reticulose rhizopods recently studied in some detail by SCHEPOTIEFF (1902) may here be mentioned once more. "*Protogenes primordialis*" possesses 12—30 fairly large nuclei. It forms large cysts in which the nuclei appear to break up into chromidia. "*P. roseus*" is a very large Vampyrellid, which acquires its colour from the red algae on which it feeds (*Chaetomorpha*). It

possesses 25—45 nuclei of fairly large size ($10\ \mu$ — $15\ \mu$ in diameter). The nuclei were never seen to divide. The organism forms large cysts, in which it segments into a brood of uninucleate young which subsequently escape. These small forms are colourless, with radiating pseudopodia — "remining one of the heliozoon-like stages of *Arcella*" (i. e. "*Nuclearia*" forms). The nuclear phenomena would repay further study. It is not certain whether chromidial stages occur in this form or not.

Consideration of these and other observations leads me to the conclusion that the Vampyrellidae are closely related to the Amoebae (*Amoebæa*), and perhaps even more closely to the shelled Rhizopods (*Thalamophora*). RHUMBLER (1904) places *Arachnula* among the *Reticulosa*, in the order *Nuda*. If this treatment were extended to the rest of the Vampyrellidae, we should have, I think, a satisfactory classification — one as reasonable as any arrangement can be at present — for these remarkably interesting, but imperfectly studied and little understood organisms.

Some remarks on the nuclear phenomena exhibited by *Arachnula*.

In the first part of this paper I have described the nuclear apparatus of *Arachnula* and the changes which it undergoes in the process of reproduction. I confined myself as far as possible to statements of fact: but in this section I wish to say something about the interpretation of the facts. It seems to me necessary to discuss this matter because some of my observations will probably be regarded by others as having a significance different from that which I attach to them.

I will begin by summarizing what I believe to be the facts concerning the nuclear conditions observable in *Arachnula*:

The active vegetative individuals of *Arachnula* are non-cellular¹⁾ organisms possessing a nuclear apparatus which consists of two parts — a considerable number of small vesicular nuclei, and a quantity of scattered granules of nuclear matter (chromidia)²⁾. The nuclei have never been seen to divide. Reproduction is effected by

¹⁾ My reasons for using this term in preference to "unicellular" and my views on the "cell theory" in relation to the Protista will be found elsewhere (see DOBELL, 1911 a).

²⁾ The "chromidia" of the vegetative forms may be, in part, as I have already pointed out, metabolic products.

multiple fission inside a cyst. During the process, the chromidia disappear. The vesicular nuclei then gradually break up into chromidia, which are distributed through the cytoplasm. When the latter divides into a brood of young individuals, each of these contains numerous chromidia. The young chromidial organisms are set free, and assume the form of minute *Arachnulae*. They subsequently acquire a nuclear apparatus like that of the original organism by some of their chromidial granules growing and becoming differentiated into vesicular nuclei — the rest probably remaining as chromidia.

Now the only natural interpretation to put upon this sequence of events is, it seems to me, the following. The phenomena observable in the cysts of *Arachnula* — and subsequently in the young organisms which escape from the cysts — represent a series of stages in a process of multiple nuclear division.¹⁾ Each nucleus of the original organism breaks up into a number of pieces — the chromidia. Many, if not all, of these subsequently develop into new nuclei — the nuclei of new individuals. An increase in the number of nuclei undoubtedly takes place: for each of the numerous new individuals — derived from one parent — itself possesses in the end a number of nuclei similar to that of the parent. Though the method by which this is effected may be debatable, this much at least is not a hypothesis — except in so far as my observations may be questioned — but a statement of fact. It follows from this that those stages during which a chromidial system is the only visible nuclear derivative present, ought not to be regarded as non-nucleate, but as transient developmental stages in the history of a nucleate organism. The young “*Nuclearia*” forms of *Arachnula*, containing chromidia but no vesicular nuclei, are not non-nucleate organisms at all — or rather, they are “non-nucleate” only if the word “nucleus” is restricted to the vesicular type of nucleus in its so-called “resting” stage.

The word “nucleus” was formerly applied to an organ which was supposed to conform more or less closely to a certain type of structure — such, for instance, as that of the “vesicular nuclei” of *Arachnula*. Now that it is known, however, that this same organ or its morphological equivalents may display the greatest diversity of form — not merely in different kinds of organisms, but also in

¹⁾ I have already urged (DOBELL 1909 b) that the chromidial phenomena in some other organisms should be thus interpreted.

the same organism at different stages in its life — it becomes necessary to modify our usage of the word "nucleus". This may be done in one of two ways. We may retain the word with its old limited significance, and invent a new word for the later known (but homologous) structures: in which case we should be attaching more importance to language than to facts — we should be blaming nature for not according with our definitions. Or, alternatively, we may confess that our word was arbitrarily and wrongly defined owing to insufficient knowledge of the things to which it was given: and accordingly we may extend it in agreement with our extended knowledge. In this case, we should blame our original word for its inadequacy in expressing the facts of nature — and not nature for failing to live up to our verbal symbolism. For my own part, there is little doubt as to which of these alternatives is the better — the second is incomparably superior to the first.

I therefore think it justifiable to say that a young *Arachnula*, which has not yet developed its vesicular nuclei, is nevertheless a nucleate organism. It possesses a nuclear system¹⁾ in a chromidial condition. The chromidia constitute a phase in the transformations undergone by the nuclei — a stage, in this case, in multiple division of the nuclei. It seems to me that if a chromidial *Arachnula* is to be regarded as non-nucleate, then every cell or organism in which the nucleus is mitotically dividing must also be regarded as "non-nucleate". For if the chromidia do not constitute a nuclear system, neither do the chromosomes and achromatic figure.

I have elsewhere urged that the nucleus is essentially a morphological conception (see DOBELL 1911), and the foregoing remarks appear to me to be consistent with such a view. MINCHIN (1912, p. 97), however, thinks that I am inconsistent: for he says "It seems to me remarkable that DOBELL . . . should apply the term nucleus to a single grain of chromatin, or to a collection of such grains, and should speak of a nucleus in the form of chromidia scattered through the cell, or in the form of a discrete system of granules (chromidia), phrases which are self-contradictory on the principles that he himself has laid down." MINCHIN is referring to my work on

¹⁾ I use this term rather than "nucleus" in this particular case in order to avoid another possible misunderstanding. For the chromidia represent — in *Arachnula* — not a single nucleus but a system of many similar nuclei. They are formed — in their entirety — by many nuclei and give rise again to many nuclei. It would, I think, avoid ambiguity if this term (nuclear system) were used instead of "nucleus" in many other similar cases.

the structure of bacteria. I described certain of these as possessing "nuclei in the form of chromidia" because I believed — and still believe — that I was able to bring forward good evidence to show that the chromidia represented a phase in the developmental history of a structure which — during other phases — deserved the title of "nucleus". I therefore — as in the case of *Arachnula*, and, as it seems to me, with justification — extended the word "nucleus" to cover all the different forms which this constituent of the organism might assume. I did not enter into a detailed discussion of this point. It seemed to me unnecessary at the time, as others had already made use of such terms as "diffuse nucleus", "distributed nucleus", etc. — terms which had given rise, so far as I could judge, to no misunderstanding. I regret that MINCHIN has misunderstood the words which I used to express my thoughts, and has consequently inferred that my views themselves are inconsistent. I realize that the difficulties are largely due to words and their significance, and I have no wish to quibble over these. But it seems to me that there is a point of real importance here also, in connexion with certain natural phenomena and their description or expression in words. For this reason, the foregoing statement seems to me worth making.

Owing to the extremely small size of the nuclear structures in *Arachnula*, I have found it impossible to ascertain many of the details of their behaviour. It seems to me highly probable that the multiple division of the vesicular nuclei is effected in a manner similar to that which occurs in the Foraminifera. (See SCHAUDINN 1894, 1895, 1903; SWARCZEWSKY 1909; etc.). The nuclei of *Calcituba* are like those of *Arachnula* on a very large scale: the products of their multiple division, if reduced to the scale of *Arachnula*, would appear as chromidia. It therefore seems justifiable to suppose that the vesicular nuclei of *Arachnula* break up into chromidia which are comparable with the numerous daughter-nuclei, formed simultaneously from a single nucleus, in *Calcituba* and other Foraminifera.¹⁾

SCHAUDINN'S observations on *Calcituba*, etc., and his interpretation of them appear to me to be trustworthy and reasonable. I am sur-

¹⁾ I have tried in vain to convince myself that the nuclei of *Arachnula*, when they are breaking up inside a cyst, pass through a series of stages such as occur in the nuclear divisions of *Calcituba*. It is easy to reconcile the appearances with such an interpretation, but for various reasons I still feel sceptical in the matter.

prised that HARTMANN (1909) should think that a re-investigation of the matter would furnish support for his notion of "polyenergid nuclei". It seems to me that most of the cases in Protozoa (e. g. *Calciutaba*, *Wagnerella*) which HARTMANN and his pupils interpret as revealing a "polyenergid" condition of the nucleus, may be far more reasonably interpreted as stages in a process of multiple nuclear division. To suppose that a nucleus which divides into a number of daughter nuclei must itself have contained these preformed — must have been itself originally a compound of many nuclei — appears to me a forced and unnecessary interpretation to put upon the facts. In *Arachnula*, at all events, I can see no support for the hypothesis of "polyenergid nuclei".

Finally, a word may be said about the "Monera" of HAECKEL (1868, 1870) — a group of organisms in which *Arachnula* has hitherto been placed. The Monera contained an assemblage of forms which were supposed to be non-nucleate — being, in HAECKEL'S words, "organisms without organs". It is not necessary to discuss here the speculations which have been based upon the assumed existence of such a group. It will suffice to point out once more that careful work has, in all cases, demonstrated the non-existence of such organisms in nature. It has yet to be demonstrated that any non-nucleate organisms exist. The investigation of the life-history of *Arachnula*, and of a number of more or less closely allied forms (cf. SCHEPOTIEFF, 1912) has demonstrated the fact that not merely are these "Monera" nucleate organisms, but that they possess nuclear systems of a morphological complexity which rivals that of any other known Protista.

Imperial College of Science, London, S. W.
April, 1913.

Literature references.

- ARTARI, A. (1889): *Morphologische und biologische Studien über Nuclearia delicatula*. CIENK. Zool. Anz. Bd. 12 p. 408.
- BÜTSCHLI, O. (1880—82): Protozoa. in: BRONN's Klass. u. Ordn. 1. Abt.
- CASH, J. (1904): On some new and little-known British freshwater Rhizopoda. Journ. Linn. Soc. (Zool.) Vol. 29 p. 218.
- CASH, J. and HOPKINSON, J. (1905): *The British Freshwater Rhizopoda and Heliozoa*. Vol. 1. Ray Soc. London.
- CIENKOWSKI, L. (1865): Beiträge zur Kenntnis der Monaden. Arch. mikr. Anat. Bd. 1 p. 203.
- (1876): Über einige Rhizopoden und verwandte Organismen. Arch. mikr. Anat. Bd. 12 p. 15.
- DELAGE, Y. et HÉROUARD, E. (1896): *Traité de Zoologie concrète*. T. 1. La cellule et les Protozoaires. Paris.
- DOBELL, C. (1909): Some observations on the Infusoria parasitic in Cephalopoda. Quart. Journ. Micr. Sci. Vol. 53 p. 183.
- (1909a): Researches on the intestinal Protozoa of frogs and toads. Quart. Journ. Micr. Sci. Vol. 53 p. 201.
- (1909b): Chromidia and the binuclearity hypotheses: a review and a criticism. Quart. Journ. Micr. Sci. Vol. 53 p. 279.
- (1911): Contributions to the cytology of the Bacteria. Quart. Journ. Micr. Sci. Vol. 56 p. 395.
- (1911a): The principles of Protistology. Arch. f. Protistenk. Bd. 23 p. 269.
- (1912): Researches on the Spirochaets and related organisms. Arch. f. Protistenk. Bd. 26 p. 117.
- DOFLEIN, F. (1911): *Lehrbuch der Protozoenkunde*. 3. Aufl. Jena.
- ELPATIEWSKY, W. (1907): Zur Fortpflanzung von *Arcella vulgaris* EHRBG. Arch. f. Protistenk. Bd. 10 p. 441.
- FRENZEL, J. (1897): *Untersuchungen über die mikroskopische Fauna Argentiniens*. I. Teil: Die Protozoen. Bibl. Zool. Bd. 4 H. 12.
- GRUBER, A. (1884): Die Protozoen des Hafens von Genua. Nova Acta Leop.-Carol.-Akad. Naturf. Bd. 46 Nr. 4.
- HAECKEL, E. (1868): *Monographie der Moneren*. Jena. Zeitschr. Bd. 4 p. 64.
- (1870): *Studien über Moneren und andere Protisten*. Leipzig.
- HARTMANN, M. (1909): Polyenergide Kerne. Biol. Centrabl. Bd. 29 p. 481.
- HERTWIG, R. u. LESSER, E. (1874): Über Rhizopoden und denselben nahestehende Organismen. Arch. mikr. Anat. Bd. 10 Suppl. p. 35.
- HICKSON, S. J. (1909): *Proteomyxa*, in LANKESTER's Treatise on Zoology. Part 1 fasc. 1.
- HOOGENRAAD, H. R. (1907): Einige Beobachtungen an *Vampyrella lateritia* LEIDY. Arch. f. Protistenk. Bd. 8 p. 216.
- LEIDY, J. (1879): *Fresh-water Rhizopods of North America*. U. S. Geol.-Surv. Vol. 12. Washington.
- MINCHIN, E. A. (1912): *An introduction to the study of the Protozoa*. London.
- MOEBIUS, K. (1888): Bruchstücke einer Rhizopodenfauna der Kieler Bucht. Abh. Akad. Wiss. Berlin.

- PENARD, E. (1903): Notice les Rhizopodes du Spitzberg. Arch. f. Protistenk. Bd. 2 p. 238.
- (1905): Notes sur quelques Sarcodinés. Rev. Suisse Zool. T. 13 p. 585.
- POPOFF, M. (1911): Über den Entwicklungszyklus von *Amoeba minuta* n. sp. Arch. f. Protistenk. Bd. 22 p. 197.
- RHUMBLER, L. (1904): Systematische Zusammenstellung der rezenten Reticulosa (Nuda + Foraminifera). Arch. f. Protistenk. Bd. 3 p. 181.
- SCHAUDINN, F. (1894): Die Fortpflanzung der Foraminiferen und eine neue Art der Kernvermehrung. Biol. Centralbl. Bd. 14 p. 161.
- (1895): Untersuchungen an Foraminiferen. I. *Calcituba polymorpha* Roboz. Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 59 p. 192.
- (1903): Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. (Vorl. Mitteil.) Arb. Kaiserl. Gesundheitsamt Bd. 19 p. 547.
- SCHEPOTIEFF, A. (1911): Untersuchungen über niedere Organismen. III. Monerenstudien. Zool. Jahrb. (Anat. Abt.) Bd. 32 p. 367.
- SCHULTZE, M. (1854): Über den Organismus der Polythalamien. Leipzig.
- SWARCZEWSKY, B. (1908): Über die Fortpflanzungserscheinungen bei *Arcella vulgaris* EHRBG. Arch. f. Protistenk. Bd. 12 p. 173.
- (1909): Zur Kenntnis der *Allogromia ovoidea* (RHUMBL.). Arch. f. Protistenk. Bd. 14 p. 396.
- TOPSENT, E. (1893): Description de *Pontomyxa flava*, Rhizopode marin, etc. Arch. Zool. exp. 3 Sér. Vol. I p. 385.
- ZOFF, W. (1885): Zur Morphologie und Biologie der niederen Pilztiere (Monadinen), zugleich ein Beitrag zur Phytopathologie. Leipzig.
- ZUELZER, M. (1910): Der Einfluß des Meerwassers auf die pulsierende Vacuole. Arch. Entw.-Mech. Bd. 29 p. 632.

Description of plates.

All the figures — except fig. 23 — are of *Arachnula impatiens* CIENK. All are drawn from fixed and stained specimens. The optical apparatus employed was the following: ZEISS large stand, tube length 160 mm; ZEISS 2 mm apochromatic homogeneous immersion (N.A. = 1,40) with compensating oculars 6, 8, 12 and 18 LEITZ achromatic aplanatic condenser (N.A. = 1,40); with critical illumination. The method of fixation and staining and the approximate magnification are given in the case of each figure. The following abbreviations are used:

- S.A. = SCHAUDINN'S sublimate-alcohol.
 Fl. = FLEMMING'S fluid (strong).
 Fe.Hx. = HEIDENHAIN'S iron-alum haematoxylin.
 B.C. = GRENACHER'S borax-carmin.

Plate 23.

Fig. 1. Small specimen of *Arachnula*, showing nuclei, contractile vacuoles, pseudopodia, etc. Apart from the short segment of an ingested cyanophyceous trichome seen on the left, the organism is devoid of food bodies. (Fl., Fe.Hx.)
 × 1500.

Fig. 2. Large individual, in a characteristic condition. The organism is filled with food bodies — only the largest of which (diatoms, trichomes of cyanophyceae) are depicted. The finer structure of the protoplasm is not shown. (Fl., Fe.Hx.) $\times 400$.

Figs. 3–8. Stages in the formation of digestive cysts by organisms feeding chiefly on diatoms.

Fig. 3. Small individual filled with diatoms and smaller food bodies. (BOVIN'S fluid, Fe.Hx.) $\times 1000$.

Fig. 4. Digestive cyst in optical section. The partially digested diatoms are not all shown. (Fl., Fe.Hx.) $\times 1000$.

Fig. 5. Digestive cyst containing many diatom shells (only 7 shown, the rest being superimposed). The organism has divided into two inside the cyst. (BOVIN'S fluid, Fe.Hx.) $\times 1000$.

Fig. 6. A portion of the protoplasm of the lower individual in the cyst in the preceding figure. Optical section, showing 2 nuclei, chromidia, etc. $\times 1500$.

Fig. 7. An individual emerging from its digestive cyst. (Only 3 empty diatom shells are shown — the rest being superimposed). (Fl., Fe.Hx.) $\times 1000$.

Fig. 8. Digestive cyst which has been vacated by an *Arachnula*. It is incrustated with bacteria, etc., and contains numerous empty diatom shells and some other undigested particles. (Fl., Fe.Hx.) $\times 1000$.

Plate 24.

Fig. 9. Individual about to form a reproductive cyst. Note the nuclei, peripheral vacuoles, the absence of chromidia, etc. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Figs. 10–15. Successive stages of development inside reproductive cysts. They are all optical sections.

Fig. 10. Early reproductive cyst, with few peripheral contractile vacuoles (only 3 seen in this optical section) and central vacuole in process of formation. Nuclei numerous and scattered. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 11. Later stage. Note the large central vacuole, with the numerous nuclei placed round it, the chromidia, etc. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 12. Later stage. The nuclei are disappearing, but their karyosomes are still distinctly visible. The cytoplasm round the remains of the nuclei is deeply stained. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 13. Still later stage. In this cyst the nuclei have completely disappeared. The cytoplasm is filled with deeply staining chromidia. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 14. Segmentation of contents of cyst by vacuolation of the protoplasm. The chromidia are aggregating in deeply staining, somewhat stellate areas of the cytoplasm. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 15. Later stage in segmentation of cyst contents. The young chromidial organisms are beginning to escape. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 16. Young chromidial form, newly escaped from cyst. Note the chromidia in the alveolar cytoplasm, the absence of vesicular nuclei, etc. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 17. An older and larger chromidial form, still without vesicular nuclei. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 18. Still larger chromidial form, containing 3 fully-formed vesicular nuclei in addition to chromidia. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 19. Later stage — a small *Arachnula* with 32 nuclei, chromidia, etc. (S.A., B.C.) $\times 1500$.

Fig. 20. Small portion of the protoplasm of a small chromidial form (similar to fig. 18) containing 3 large vesicular nuclei. One of these is shown, with numerous stages in the formation of other similar nuclei from the chromidia. (S.A., B.C.) $\times 2000$.

Fig. 21. Small portion of the protoplasm of a large *Arachnula* containing but little food; showing structure of cytoplasm, nuclei, and chromidia (S.A., B.C.) $\times 2000$. Optical section.

Fig. 22. Small portion of the body of a large *Arachnula* filled with ingested flagellates. The latter (8 are shown) appear as pale globules, each with a nucleus, and are so crowded together that they obscure the structure of the *Arachnula* completely. The cytoplasm of the latter is very deeply stained, and filled with coarse particles. A single nucleus belonging to the animal can be seen squashed and deformed by the bodies of the ingested flagellates (above, and slightly to the left). (S.A., B.C.) $\times 2000$. Compare with fig. 21.

Fig. 23. A single nucleus from a large multinucleate *Amoeba* of the *proteus* group. For comparison with nuclei of *Arachnula* (see p. 323). (Picro-acetic acid, B.C.). $\times 1500$. Optical section.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Kleinere Mitteilungen.

Regarding “une nouvelle Coccidie aviaire, *Eimeria bracheti* (n. sp.)”.

By

Philip B. Hadley,

From the Division of Animal breeding and Pathology, Rhode Island Agricultural
Experiment Station, Kingston, R. I., U. S. A.

In a recent number of this journal,¹⁾ Mons. Pol. GÉRARD, under the above title introduces to protozoology a new coccidium, *Eimeria bracheti*. It is assumed by the author that this new species of the genus *Eimeria* is identical with *Pfeifferia avium* LABBE, and with *Eimeria avium* as the latter name has been used by the present writer in a paper²⁾ dealing with the morphology of the coccidium occasioning the various forms of coccidiosis of poultry in the United States. Mons. GÉRARD contends that his *Eimeria bracheti* resembles closely the *Eimeria avium* as described by the present writer; but that both are different from the *Eimeria avium* mentioned by FANTHAM,³⁾ in connection with the English grouse disease.

This contention, as will easily be observed from even a casual reading of Mons. GÉRARD's paper, is wholly unsupported by evidence. No fact

¹⁾ Arch. f. Protistenk. 1913 Bd. 29 p. 193—202, Pls. 3 and 4.

²⁾ *Eimeria avium*: A morphological study. Arch. f. Protistenk. 1911 Bd. 23 p. 7—50, Pls. 1 and 2.

³⁾ The morphology and life-history of *Eimeria* (*Coccidium*) *avium*: A sporozoön causing a fatal disease among young grouse. Proc. Zool. Soc. London 1910 p. 671—691, Pls. 45—48.

is introduced to demonstrate a morphological or biological difference between *Eimeria bracheti* and *Eimeria avium*. In fact the alleged difference, aside from the first statement that it exists, is wholly ignored in the body of Mons. GÉRARD's contribution. Until definite and valid differences are pointed out, the present writer persists in his belief that the *Eimeria avium* of FANTHAM and of HADLEY are identical; and that, in all probability, the protozoan studied by Mons. GÉRARD belongs to the same species. At present "*Eimeria bracheti* (n. sp.)" has nothing to recommend its acceptance as a new addition to the genus *Eimeria*.

Kingston, July 24, 1913.

G. Pätz'sche Buchdr. Lippert & Co. G. m. b. H., Naumburg a. d. S.

Princeton University Library



32101 074861624

