

# ACTA PROTOZOO- LOGICA

*REDACTORUM CONSILIUM*

E. M. CHEISSIN (LENINGRAD), S. DRYL (WARSZAWA),

O. JÍROVEC (PRAHA), B. PÁRDU CZ (BUDAPEST),

I. G. POLJANSKY (LENINGRAD), Z. RAABE (WARSZAWA)

VOLUMEN I

Fasciculi: 1—13

W A R S Z A W A 1 9 6 3

NOTICE TO AUTHORS

Acta Protozoologica is intended as a journal serving for the publication of original papers embodying the results of experimental or theoretical research in all fields of protozoology with the exception of purely clinical reports. The papers must be concise and will not be accepted if they have been previously published elsewhere. After acceptance by the Editors papers will be printed in the order as they have been received, in the possibly shortest time.

Papers are accepted in English, French, German and Russian. Every paper should begin with the name and postal address of the laboratory, name and the surname of the author, title in the language of the text and translation of the title into the author's own language. The paper should be accompanied by a summary in the language of the text, not exceeding 100 words, also with the translation into the author's own language. The authors speaking English, French, German or Russian should translate the title and the summary into another one of the 4 languages accepted in the Journal. In the Russian texts also the name and the postal address of the laboratory, legends of tables, plates and text-illustration must be translated, the translation of the summary may be somewhat more extensive, and the name of the author should be given additionally also in the Latin alphabet.

Manuscript should be a doublespaced typescript (30 lines on one side of a sheet) with a normal margin. No elements of the text should be fully typed in capitals nor in spaced set (only underlining with pencil is admissible). In decimal fractions points (not commas) should be used. The generally accepted abbreviations and symbols are recommended. Nomenclature must agree with the International Code of Zoological Nomenclature, London 1961. The original and one carbon copy of the whole text material should be supplied.

References must be cited in the text indicating only the author and year, thus: „Kinosita 1945 found that, etc.". Only all references cited in the text should be listed. The list must be arranged as follows:

Ehret C. F. and Powers E. L. 1959: The cell surface of Paramecium. Internatl. Rev. Cytol. 8, 97—133.

Gelei J. von 1939; Das äussere Stützgerüstsystem des Parameciumkörpers. Arch. Protistenk. 92, 245—272.

Titles of references are given in their original language (not translated). In papers written in English, French or German, the Cyrillic type of the Russian references is transliterated according to the international system (ISO Recommendation R 9 September 1954). This regulation is not applied to names if there exists their traditional spelling. Also the author may freely choose the transliteration of his own name. In Russian papers, the Russian references are cited in Cyrillic, the others in the Latin alphabet, but they must be listed all together in Latin alphabetical order.

The following material should be supplied on separate sheets: 1. the running title for the page headlines, 2. tables, 3. legends for text-figures, 4. legends for plates. Line-drawings will be published in the text, photographs and raster-figures on separate plates. No coloured photographs can be published presently. Lettering on photographs and drawings should be marked in pencil. With no regard to the language of the text, only the Latin lettering, arabic numerals or generally accepted symbols are admissible for marking on illustrations. Numbering of text-figures, plates and tables must also be marked in pencil, as well in the legends as in the text. Tables are denoted in English and in French — Table, in German — Tabelle, in Russian — Таблица. In the Russian papers text-figures should be determined — Рис. and all the others — Fig. Plates are denoted in English and French — Pl., in German — Taf., in Russian — Табл.

Galley proofs are sent to the authors. Authors receive 100 reprints without covers.

Manuscripts may be submitted to each member of the Editorial Board or directly to the Office: Acta Protozoologica, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa 22, ul. Pasteura 3, Poland.

Department of Protozoology of the Institute of Parasitology,  
Czechoslovak Academy of Sciences, Praha 2, Viničná 7

Jiří LOM

Discovery of a *Tripartiella* in the urinary tract  
of *Phoxinus phoxinus* L.

Nález zástupce r. *Tripartiella* v močovém traktu stěvlí

In our study of protozoan parasites of Czechoslovak fishes we came across an interesting urceolariid ciliate parasitizing the urinary tract of minnows. The ciliate differed from all others, previously described from urinary tract of fresh water fishes, being the sixth bladder-inhabiting representative of the family *Urceolariidae* in these hosts. In the urinary tract of fresh water fishes thus far members of two urceolariid genera have been encountered, namely, *Trichodina* Ehrbg. and *Vauchomia* Mueller. First descriptions were those of Mueller, who found *Vauchomia renicola* in the urinary tract of *Esox niger* in 1931, and seven years later in *Esox masquinongy* a second species, *Vauchomia nephritica*, both from North America. From European fishes we know three endoparasitic species, *Trichodina urinaria* Dogiel, 1940 from perches, *Perca fluviatilis* L., *T. alburni* Vojtek, 1957 from *Alburnus alburnus* L. and *T. polycirra* Lom, 1960 from *Rutilus rutilus* L.; the last species has been found recently by Dr. R. Ergens also in the urinary tract of *Abramis brama* L.

The subject of the present paper is the description of a new representative of the third urceolariid genus, *Tripartiella* Lom 1959, belonging to the subgenus *Paratrachodina* Lom 1963, from the urinary tract of minnows, *Phoxinus phoxinus* L. Thanks are due to Dr. R. Ergens, who has been kind enough to draw my attention to the occurrence of this ciliate; to him our best thanks are expressed. The method used on studying this species was the same as in the previous publications on trichodinids (Lom 1961, 1963).

*Tripartiella* (*Paratrachodina*) *phoxini* n. sp.

This species has hitherto been found in the urinary bladder and ureters of *Phoxinus phoxinus* L. in specimens of 9—14 cm in length, only in the river Petrovický potok in Silesia, Czechoslovakia. However, it may be assumed that a careful ichthyoparasitological research would reveal the presence of this parasite even in other localities of the area of distribution of its host. For Instance Vojtek (personal communic.) found an undetermined ciliate in *Phoxinus phoxinus* from south Moravia, Czechoslovakia, which most

probably was the species under consideration. The extensity of infection has been about 10% or less the intensity being about 100—200 ciliates per host.

*T. (P.) phoxini* is regularly circular in oral view, without prominent folds on its surface (as in *T. polycirra* Lom) and loafshaped in side view. The diameter ranges from 35 to 44  $\mu$ . The buccal ciliature corresponds to a *Tripartitiella* type as known from species inhabiting gills (Fig. 1 A). The adoral zone (the joint course of polykinety and haplokinety on the oral surface) makes a turn of only 180—270° before it plunges into the vestibulum. It is noteworthy to stress this variability of length, because it is almost constant in other trichodinids.

Inside of the infundibulum both rows separate; the polykinety splits into a six-row peniculus, making half of a spiral inwards. To its end a horse-shoe structure is attached. This structure, most probably identical with the third triple penicular kinety of other peritrichs (Lom 1962), bears long cilia beating inwards the cytostome proper. The haplokinety encircles at first the outer lip of infundibulum and then performs also its uncomplete spiral — counterpart to peniculus — downwards on the infundibular wall, being closely accompanied by an impregnable supporting structure. Before the haplokinety dips into infundibulum, a short stretch of a simple kinety extends along it, giving rise to a daughter haplokinety during division.

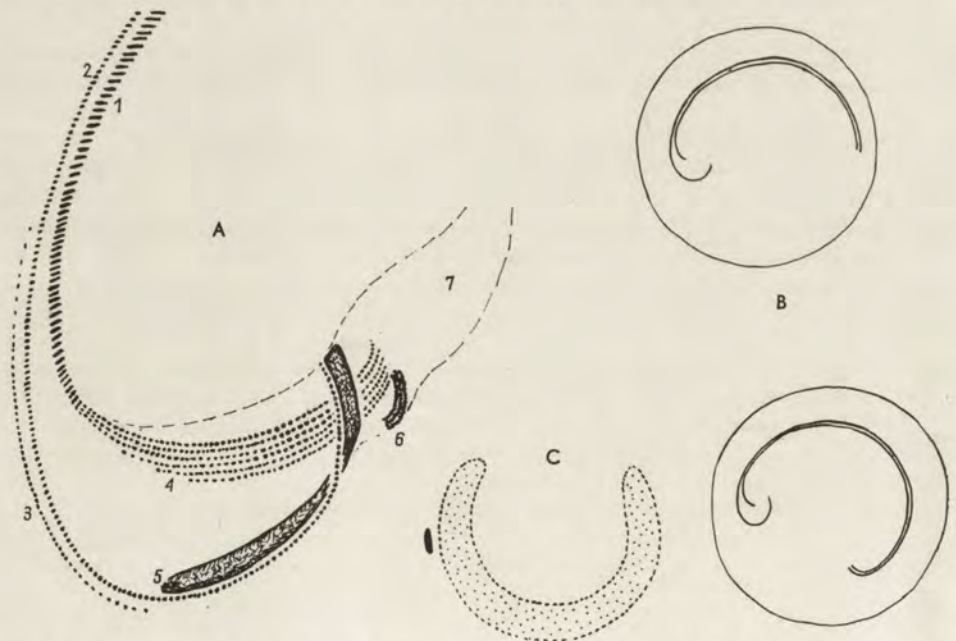


Fig. 1. A. The buccal infraciliature of *T. (Paratrichodina) phoxini*. Viewed from the oral surface, schematised. 1 — polykinety; 2 — haplokinety; 3 — „germinal” kinety, giving rise to daughter haplokinety and a part of daughter peniculus; 4 — peniculus; 5 — impregnable structure; 6 — a horseshoe shaped structure, most probably identical with the third penicular triple row of other peritrichs, just at the cytostome; 7 — lumen of the cytopharynx. B. Two extents of development of the adoral zone. C. A typical nuclear set

In unattached animals the adhesive disc is rather flat and can be inverted inwards in ciliates adhering to the epithelium. In silver impregnated specimens its mean diameter is  $33\ \mu$ , the variation range being  $30\text{--}37\ \mu$ . It is encircled by a  $2.4\text{--}3\ \mu$  wide border membrane, finely striated. The average diameter of the denticulate ring is  $21\ \mu$  (variation range from  $19$  to  $22\ \mu$ ). The number of denticles varies from  $30$  to  $35$ , the mean value being  $32$ . Their real shape is revealed by silver impregnation (Pl. I): the blades are only slightly bent and their width is almost the same throughout their length, assuming thus a plank-like appearance. There is an indication of a notch in anterior borders of the blade, just near the central part of the denticle, reminding of *T. (Paratrichodina) incisca*. The thorn is relatively short and thick, widening centripetally. There are  $7$  (sometimes  $6$ ) radial pins to one denticle. The center of the disc is dark in Ag-impregnated specimens, sometimes displaying a sort of faint, more clear amorphous structures, being most possibly derived from remnants of the „mother” set of denticles. Two stages of denticle formation are seen in Pl. I 3, 4. These figures show the thorns to be formed at last during the constitution of a new denticulate ring and these thorns are resorbed at last in denticles of the remnant of the old denticulate ring.

A slide containing type preparation of *T. (Paratrichodina) phoxini* has been deposited in the collection of the Parasitological Institute of the ČSAV.

#### Concluding remarks

*T. (Paratrichodina) phoxini* complies completely with the characteristics of the subgenus *Paratrichodina*, both in its buccal ciliature and denticle shape, and agrees with it also in its relatively small dimensions. However, it occupies a quite different biotope. Up to the present time, the genera *Tripartiella* and *Trichodinella* were supposed to inhabit only gills of fishes. Only in cases of a massive infection they can be found also on the skin of fish, but in this case they are far from being so numerous as on the gills of the same hosts (not to mention of course the occurrence of trichodinellids on the skin of fry, the properties of which may be compared with gills of adult fish.).

The present findings show the representatives of these group — the subgenus *Paratrichodina* at least — to be capable of both ecto- and endoparasitic mode of living. Thus they approach *Trichodina*, which moreover is not bound only to fish but also to different invertebrate hosts.

The relation of the length of the adoral zone to the microecological conditions remains to be studied. We are inclined to assume that it is not directly influenced by the mode of feeding, as three genera known from urinary bladder of fish considerably differ in the length of their adoral zone — *Vauchomia* up to  $3$  turns, *Trichodina* about one turn and *T. (Paratrichodina) phoxini*  $180\text{--}270^\circ$  only. The environmental conditions of all three species are at least quite similar. In assuming not entirely osmotroph feeding, the length of the adoral zone is negligible in relation to the food supply of the ciliate (cellular debris or fluid in this case). The situation might be similar to that of some free living peritrichs — e.g., *Campanella umbellaria* has more than  $3$  turns and other *Epistylis* only one turn, both feeding on bacteria with presumably the same success. The reasons of the different evolution of the adoral zone has to be looked for in different factors — perhaps in some special influences during evolution. The most original state is probably also in

*Mobilina* one turn of the adoral zone. There might be also some relation between the body dimensions and the length of the adoral zone. In small trichodinellids there is  $1/2$ – $3/4$  of a turn, in *Trichodina* which are in general bigger it is about one turn, and *Vauchomia* has also relatively large dimensions; as for free living forms, *Campanella umbellaria* is also a big ciliate.

### Summary

A description is given of a new urceolariid ciliate found in the urinary tract of minnow, *Phoxinus phoxinus* L. Because of the structure of its buccal ciliature as well as denticle shape, it has been placed into the genus *Tripartitiella* (subg. *Paratrichodina*) whose members have been hitherto recorded only as ectoparasites of fishes. A short discussion concerns the degree of development of the adoral zone in this group.

### SHRNUTÍ

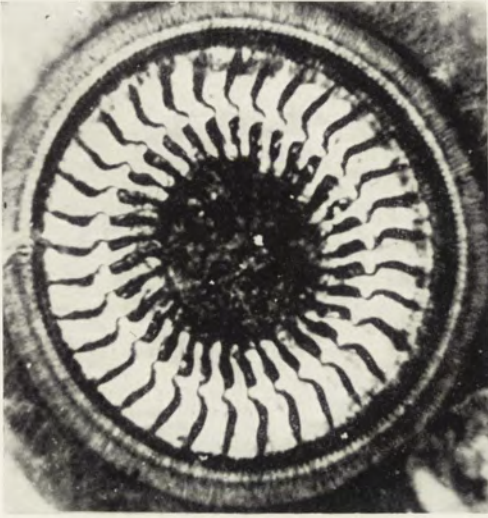
Je popisován nový nálevník čel. *Urceolariidae*, z močového traktu střevlí, *Phoxinus phoxinus* L. Strukturou bukkální ciliatury i tvarem zoubků se řadí do rodu *Tripartitiella* (podrod *Paratrichodina*) jehož zástupci byli až dosud nalézáni jen na rybím povrchu. Krátká diskuse se týká různého stupně vývoje adorální zony u této skupiny.

### REFERENCES

- Dogiel V. A. 1940: K voprosu o sistematike roda *Trichodina*. Trudy Len. Obsč. Jestestvoisp. 68, 8–31.
- Dogiel V. A. 1948: Parazitickéšie prostejšie ryb zaliva Petra Velikogo. III. Infuzorii roda *Trichodina*. Izvestia VNIORCH 27, 44–66.
- Lom J. 1959: On the systematics of the genus *Trichodinella* Sráemek-Hušek (*Brachyspira* Raabe). Acta Parasit. Polon. 7, 573–590.
- Lom J. 1960: On two endozoic trichodinids, *Trichodina urinaria* Dogiel 1940 and *Trichodina polycirra* n.sp. Acta Parasit. Polon. 8, 169–180.
- Lom J. 1961: Ectoparasitic trichodinids from fresh water fish in Czechoslovakia. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 25, 215–228.
- Lom J. 1962: On the buccal ciliature of peritrichs. Protozoology. Transactions of the Ist. Internat. Protozool. Conf. Praha 1961 (in press).
- Lom J. 1963: The ciliates of the family *Urceolariidae* inhabiting gills of fishes (The *Trichodinella* group). Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 27 (in press).
- Mueller J. F. 1922: *Trichodina renicola*, a ciliate parasite of the urinary tract of *Esox niger*. Roosevelt Wildlife Ann. 3, 139–154.
- Mueller J. F. 1938: A new species of *Trichodina* (*Ciliata*) from the urinary tract of the muskalonge, with a repartition of the genus. J. Parasitol. 24, 251–258.
- Vojtek J. 1957: K poznání endoparasitických brousilek rodu *Trichodina* Ehrenberg 1830. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 21, 173–180.

### EXPLANATION OF THE PLATE I

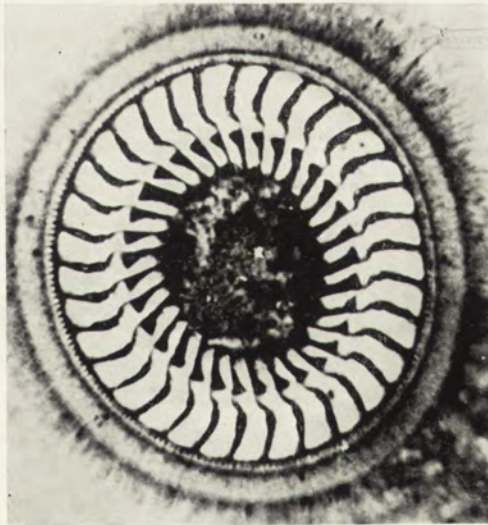
- Silver impregnated adhesive discs of *T. (Paratrichodina) phoxini* sp.n.
- 1, 2: Two typical specimens
- 3: A specimen soon after division; the denticles of the new denticulate ring have their inner thorns not yet formed. In the center, a ring of incomplete remnants of old denticles still persists
- 4: An individual with developing thorns, which still do not reach the „adult” size. The remnants of the old denticulate ring became quite insignificant



1



3



2



4

J. Lom

auctor phot.





Institut Zoologique de l'Université Jagellonne, Kraków, św. Anny 6

Anna CZAPIK

## La morphogenèse du Cilié *Cyclidium citrullus* Cohn (*Hymenostomatida*, *Pleuronematina*)

Morfogeneza orzęska *Cyclidium citrullus* Cohn (*Hymenostomatida*,  
*Pleuronematina*)

Le sous-ordre *Pleuronematina* bien que peu nombreux a été reconnu en tant que groupe important au point de vue phylogénétique. Cette opinion date depuis l'hypothèse de Fauré-Fremiet 1950 qui a constaté, à la suite de recherches comparatives, que morphologiquement les *Pleuronematina* sont étroitement liées au groupe parasite des Thigmatriches qui, en conséquence, se sont probablement développées à partir de ces premières. Chez certains chercheurs américains (Corliss 1956) on remarque une tendance à établir une parenté directe entre quelques groupes et le sous-ordre *Tetrahymenina*, considéré en tant que groupe central dans l'évolution des Holotriches supérieurs. L'intérêt éveillé par ce problème s'est exprimé dans de nombreuses publications.

Plusieurs travaux ont été consacrés à la morphologie du *Cyclidium*, dont les plus récents (Berger, Thompson), basés sur la méthode de l'imprégnation à l'argent, décrivent le système argentophile et la ciliature buccale. En ce qui concerne la morphogenèse de ce genre, Thompson 1958 n'en donne qu'une brève mention, affirmant que la morphogenèse (les individus fixés à l'argent pendant la division) ressemble d'une façon frappante à celle des *Tetrahymenina*. Il propose en conséquence, conformément aux tendances des auteurs américains, d'inclure le genre *Cyclidium* non dans le groupe *Pleuronematina* mais dans le sous-ordre *Tetrahymenina*. La mise au point de ce problème est possible à la suite d'une étude exacte de la morphogenèse des espèces appartenant au groupe *Pleuronematina*, en la comparant avec *Tetrahymenina* et avec *Thigmatrichida*.

L'objet du travail présent — l'espèce *Cyclidium citrullus* Cohn — a été cultivé sur du foin plongé dans de l'eau de robinet. La culture se maintenait bien pendant quelques semaines. Les préparations effectuées d'après la méthode sèche de Klein étaient claires et distinctes. Les gouttes d'eau contenant les Ciliés étaient séchées à l'aide d'un séchoir à cheveux, grâce à quoi les Ciliés ne formaient pas une masse compacte mais restaient dispersés. Les Ciliés imprégnés à l'argent étaient photographiés avec la contraste-phase ce qui améliorait l'expressivité des images.

*Cyclidium citrullus* a le corps allongé, elliptique, plus ou moins élargi, d'environ 30  $\mu$  de longueur. Le péristome est situé dans une dépression assez profonde de la partie latérale du corps et atteint les 2/3 de la longueur de l'animal. La localisation de la zone adorale des membranelles (AZM) ressemble à celle de cette zone chez *Cyclidium glaucoma*, décrite par Thompson 1958. La membrane ondulante (UM) se trouve à droite du cytostome et vers la moitié du corps elle dévie de 90° entourant ainsi la cavité buccale. La membrane ondulante a l'allure d'une ligne continue, les cinétosomes n'étant pas visibles. Sur les parois de la cavité buccale on peut distinguer les stries fines observées également par Thompson chez *Cyclidium glaucoma*. En face de l'UM sont

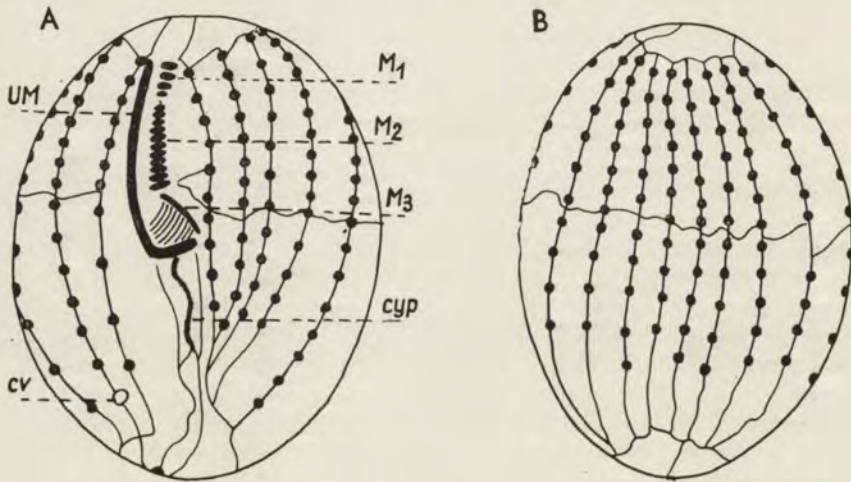


Fig. 1. *Cyclidium citrullus* Cohn, vue du côté ventral et dorsal

situées trois membranelles. Les deux premières, parallèles à l'UM, possèdent des cinétosomes semblables à de larges et grosses stries; la  $M_1$  est relativement courte — elle comprend 4 ou 5 cinétosomes;  $M_2$ , par contre, plus longue et plus large, en possède 10 ou 11 (ses cinétosomes, minces dans la partie antérieure, deviennent de plus en plus larges dans la partie postérieure);  $M_3$ , qui n'est qu'un prolongement de  $M_2$  dévié obliquement vers la gauche, démontre une structure différente, visible sur les préparations en tant qu'une ligne mince continue, ressemblant plutôt à l'UM qu'aux autres membranelles (Fig. 1).

En général le contour de la zone adorale des membranelles ressemble fort chez *Cyclidium* à celui de la même zone chez le genre *Ancistrumina* (*Thigmotrichida*) décrite par Raabe 1959.

Au dessous du péristome on trouve le cytoproct qui sur les préparations imprégnées à l'argent a la forme d'une large et sombre ligne s'étendant en direction de méridien. Des deux côtés du cytoproct on distingue deux fines fibrilles que se joignent aux fibrilles commençant aux extrémités de cinéties somatiques. Le cours des fibrilles et leur façon de se joindre démontrent une certaine variation individuelle.

Sur le pôle postérieur dans le prolongement de ces fibrilles on remarque un groupe de deux ou peut-être de trois cinétosomes formant la base du cil caudal. Le porus de la vacuole contractile localisée dans la partie postérieure du corps se trouve sur la deuxième cinétie somatique (à droite du péristome).

La ciliature somatique comprend 16 cinéties méridiennes disposées à intervalles réguliers. Dans la partie antérieure du corps ces cinétiés s'interrompent à une distance égale du pôle, autour duquel on trouve donc un cercle exempt de cinéties. Ce champ n'est traversé que par deux fines fibrilles prenant naissance à l'UM et à l'AZM et atteignant les cinéties de la partie opposée du corps. Les extrémités des cinéties sont liées par une fine fibrille ondulée. Les cinéties n'atteignent également pas le pôle postérieur; ici le champ sans cinéties n'est traversé que par une fibrille passant du cytophyge à la partie opposée du corps. Une mince fibrille ondulée passe un peu au-dessus de la partie médiale entourant le corps du Cilié et liant ainsi tous les méridiens. Les cinéties somatiques possèdent de 11 à 16 cinétosomes répartis d'une façon inégale — la majorité est concentrée dans la partie antérieure du corps, séparée par la fibrille transversale. Dans la partie postérieure elles sont moins denses; la partie terminale en est privée. Seul le pôle possède un long cil caudal situé dans une dépression.

Comme il a été déjà mentionné le système de la zone adorale de membranelles chez *Cyclidium* ressemble fort au même système chez le genre *Ancistrumina* (*Thigmotrichida*). La morphogénèse a été observée dans ce groupe par Ch at t o n et L w o f f 1936 pour l'espèce *Proboveria loripedis*. La ciliature buccale de cette espèce se compose aussi de deux cinéties: la cinétie 1 correspondant à l'UM et la cinétie ABC composée de trois secteurs qui correspondent aux trois membranelles chez *Cyclidium*.

Chez *Cyclidium citrullus* de même que chez *Proboveria loripedis* les deux cinéties qui forment l'AZM sont des cinéties stomatogènes.

La morphogénèse s'effectue de la manière suivante (Fig. 2, A, B, C, D, E):

1. Durant la première phase de la division les cinétosomes des cinéties stomatogènes se divisent et divergent perpendiculairement par rapport aux cinéties. L'AZM perd sa forme régulière et son contour devient beaucoup plus épais. Les divisions suivantes des cinétosomes qui se reproduisent toujours dans la même direction sont la cause de la formation des stries transversales, qui graduellement convergent vers le côté; en même temps les cinétosomes de la partie inférieure transversale de l'UM qui se divisent perpendiculairement par rapport à cette dernière, suscitent la formation continue de nouvelles stries dans la partie postérieure du corps. Les stries fines de la cavité buccale disparaissent. Les cinéties somatiques ne subissent jusqu'à là aucun changement. Au début de cette phase le cytophyge existe encore.

2. Pendant la deuxième phase les deux cinéties stomatogènes disparaissent, remplacées par un champ anarchique de cinétosomes composé de bandes irrégulières à largeur variable. Ce champ occupe une large surface, s'étendant sur presque toute la longueur du corps de l'animal. Le cytophyge et les fibrilles qui l'accompagnent disparaissent. Le nombre des cinétosomes dans les cinéties somatiques commence à augmenter: il y en a environ 10 dans la partie antérieure et environ 8 dans la postérieure.

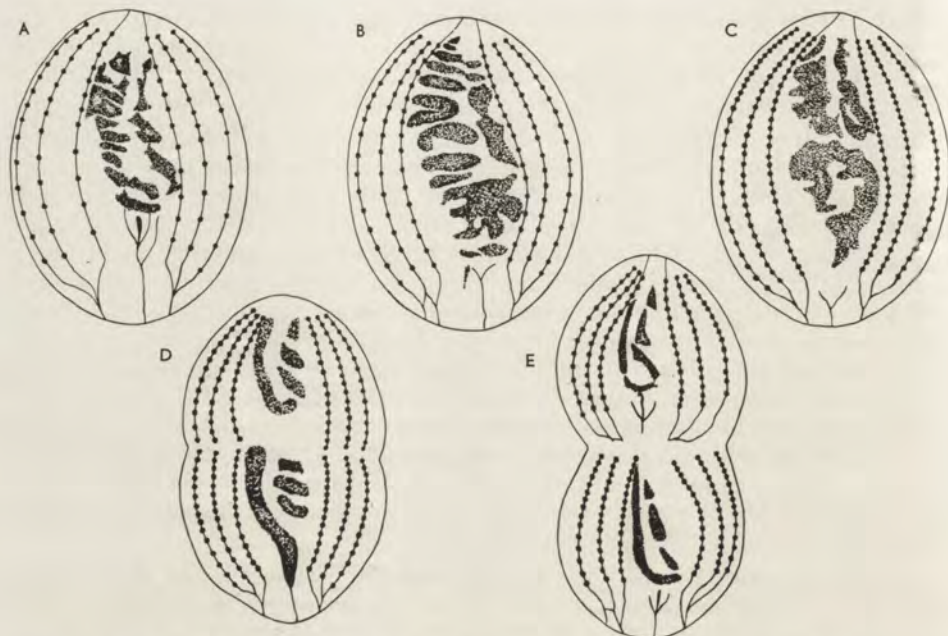


Fig. 2. Les phases de la morphogénèse chez *Cyclidium citrullus*

3. Dans la troisième phase le champ anarchique des cinétosomes se divise distinctement en deux parties, supérieure et inférieure, correspondant aux futurs proter et opisthe. Simultanément les bandes irrégulières se concentrent et s'écartent formant ainsi le contour de la future AZM. A l'emplacement futur du cytophyge de l'opisthe on voit apparaître une large bande verticale. Les cinéties s'interrompent à l'équateur du corps. La quantité des cinétosomes à cette étape est de deux fois supérieure à celle de la phase d'interscission: dans la partie antérieure tout comme dans la partie postérieure le nombre de cinéties est égal à présent environ à quinze. Chez le proter apparaît la vacuole contractile (la vacuole de l'opisthe fonctionne durant tout le processus de la morphogénèse).

4. Durant la quatrième phase le champ anarchique du côté droit du corps forme une ligne verticale, large et irrégulière au début, qui formera par la suite le bras vertical de l'UM. Le champ anarchique du côté gauche forme trois larges stries horizontales correspondant aux cinéties G, H et J décrites par Ch a t t o n et L w o f f. Ces stries sont plus distinctes chez l'opisthe que chez le proter, comme l'ont noté les auteurs français chez *Proboveria loripedis*. Les cinéties somatiques se divisent et le corps commence à s'amincir.

5. À la cinquième phase les stries G, H, J adaptent une position parallèle à l'UM et reconstruisent les trois membranelles. Le cytophyge, avec les fibrilles qui l'accompagnent, apparaît chez les deux individus.

Th o m p s o n écrit que: „the silver picture of *Cyclidium glaucoma* including stomatogenesis is strikingly similar to the genus *Tetrahymena*” sans

présenter toutefois de données plus détaillées. Comme il en résulte des observations présentées dans le travail présent, il n'existe aucune ressemblance essentielle entre la morphogenèse de cette espèce et celle de *Tetrahymena*. Comme on le sait des recherches de Gelei 1935 et de Frankel 1960 la nouvelle bouche chez le genre *Tetrahymena* prend naissance chez l'opisthe du champ anarchique formé au lieu approprié par une des cinéties somatiques joignant le cytostome avec le cytophyge („Richtungsmeridian" de Gelei, la cinétie 1 chez Frankel). Au cours de tout le processus de la morphogenèse le cytostome du proter ne subit aucun changement. Chez *Cyclidium citrullus* par contre l'UM et l'AZM jouent le rôle des cinéties stomatogènes et ce qui est essentiel, dès le début du processus tout l'appareil buccal du proter subit une désorganisation complète formant un grand champ anarchique de cinétosomes qui graduellement reforme la bouche aussi bien du proter que de l'opisthe. Ces différences essentielles contredisent la conclusion de Thompson d'après laquelle on devrait classer le genre *Cyclidium*, en se basant sur le cours de sa morphogenèse, dans le sous-ordre *Tetrahymenina* au lieu de le maintenir dans *Pleuronematina*.

Il nous reste encore à comparer la stomatogenèse chez *Cyclidium* et chez le sous-ordre *Tigmotrichida* qui, d'après les auteurs contemporains s'est développé à partir de *Pleuronematina*. Chez *Proboveria loripedis* (Chatton et Lwoff 1936) de même que chez *Cyclidium* les deux cinéties adorales sont stomatogènes: la première (1), uniforme, correspond à l'UM chez *Cyclidium*, la deuxième se compose de trois secteurs (ABC) analogues à ses trois membranelles. Au début de la division le cytostome disparaît, les cinétosomes des deux cinéties se multiplient et finissent par combler l'espace qui les sépare tout comme cela a lieu chez *Cyclidium*. On constate une divergence entre les deux espèces durant la phase suivante: les contours des cinéties stomatogènes subsistent chez *Proboveria* tandis que chez *Cyclidium* ils se fondent entièrement en nombreuses bandes dispersées d'une façon chaotique. La convergence apparaît de nouveau dans une phase plus avancée (4): chez *Proboveria* les cinétosomes de la cinétie 1 donnent en se multipliant naissance chez l'opisthe aux trois stries distinctes perpendiculaires à la cinétie maternelle; chez *Cyclidium* les nombreuses bandes chaotiques forment de même trois larges stries perpendiculaires aux cinéties stomatogènes. Chez les deux espèces les stries se retournent, se disposent sous un angle aigu par rapport à la cinétie 1 (UM) et ensuite, parallèlement à elle; enfin elles reconstruisent les trois membranelles. Chez *Cyclidium*, les cinéties stomatogènes ayant disparu, la bouche des deux individus se forme à nouveau. Chez *Proboveria*, d'après Chatton et Lwoff, seul l'opisthe doit la reconstruire à nouveau; le proter par contre obtient une grande partie de la cinétie 1 et la cinétie ABC toute entière. Ce n'est qu'en cela que consiste la différence entre les deux espèces en admettant que les auteurs français ont vu toutes les phases de la stomatogenèse de *Proboveria loripedis*.

Cette comparaison démontre que la stomatogenèse chez *Cyclidium* se produit d'une manière tout à fait différente que chez *Tetrahymena* ressemblant par contre nettement à la stomatogenèse de *Proboveria*. Seule la deuxième phase, durant laquelle les cinéties stomatogènes se transforment en bandes chaotiques est tout à fait spécifique pour ce genre et n'a jamais été remarquée ni chez *Proboveria*, ni chez aucun des Ciliés examinés jusqu'ici.

Durant les autres phases la ressemblance entre la morphogenèse de *Cyclidium* et de *Proboveria* est incontestable. Il en résulte en tout cas que le genre *Cyclidium* est plus proche du groupe *Thigmotrichida* que de *Tetrahymenina* et que son déplacement vers ce dernier sous-ordre serait sans fondement. L'étude de la morphogenèse des autres genres appartenant aux *Pleuronematina* pourrait nous fournir une réponse définitive à la question s'il est juste de considérer ce sous-ordre en tant que groupe évolutif initial pour les *Thigmotrichida*.

### Résumé

Les recherches sur la morphogenèse du Cilié *Cyclidium citrullus* Cohn ont mis en évidence que les deux cinéties formant la zone adorale des membranelles (AZM) sont chez cette espèce stomatogènes, de même que chez les *Thigmotrichida*. On a distingué 5 phases de la stomatogenèse; la plus spécifique est la deuxième phase, quand toute l'AZM se désorganise en donnant naissance à un champ anarchique des cinétosomes, qui s'étend sur presque toute la longueur du corps prenant forme des irrégulières bandes transversales. Un tel stade n'a été rapporté chez aucun Cilié étudié jusqu'à présent. Les phases suivantes ressemblent fort à la stomatogenèse de *Proboveria loripedis* (*Thigmotrichida*) et, par contre, elles ne montrent d'aucune convergence aux stades analogues chez *Glaucoma chattoni* (*Tetrahymenina*). Ces résultats confirment la thèse postulant que le groupe *Pleuronematina* soit en effet initial pour les *Thigmotrichida* et que sa parenté avec le sous-ordre *Tetrahymenina* soit plus éloignée.

### STRESZCZENIE

Badania nad morfogenezą wymoczka *Cyclidium citrullus* Cohn wykazały, że podobnie jak u *Thigmotrichida* obie kinety tworzące adoralną strefę membranelli (AZM) są stomatogenne. W procesie stomatogenezy wyróżniono 5 faz, z których najbardziej charakterystyczna jest druga, kiedy to cała AZM ulega dezorganizacji tworząc anarchiczne pole kinetosomów, ciągnące się w postaci nieregularnych poprzecznych smug poprzez prawie całą długość ciała. Stadium to nie zostało dotąd stwierdzone u żadnego z badanych wymoczków. Pozostałe fazy przypominają silnie stomatogenezę u *Proboveria loripedis* (*Thigmotrichida*) natomiast nie wykazują żadnej zbieżności z analogicznym procesem u *Glaucoma chattoni* (*Tetrahymenina*). Wyniki te przemawiają za tym, że grupa *Pleuronematina* stanowi istotnie punkt wyjściowy dla *Thigmotrichida*, natomiast jej pokrewieństwo z podrzędem *Tetrahymenina* jest bardziej odległe.

## BIBLIOGRAPHIE

- Berger J. 1959: The comparative morphology of two species of *Cyclidium* (*Ciliata*, *Hymenostomatida*). J. Protozool. 6 (Suppl.), 13.
- Berger J. and Thompson J. 1960: A redescription of *Cyclidium glaucoma* O.F.M. (*Ciliata: Hymenostomatida*) with particular attention to the buccal apparatus. J. Protozool. 7, 256—262.
- Chatton E. et Lwoff A. 1936: Les remaniements et la continuité du cinétome au cours de la scission chez les Thigmotriches *Ancistrumidae*. Arch. zool. exp. gén. 78, 84—91.
- Corliss J. 1956: On the evolution and systematics of ciliated *Protozoa*. Syst. Zool. 5, 68—140.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Morphologie comparée et systématique des Ciliés. Bull. Soc. Zool. France 75, 109—122.
- Frankel J. 1960: Morphogenesis in *Glaucoma chattoni*. J. Protozool. 7, 362—376.
- Gelei J. 1935: Der Richtungsmeridian und die Neubildung des Mundes während und ausserhalb der Teilung bei den Ciliaten. Biol. Zentralbl. 55, 436—445.
- Raabe Z.: Recherches sur les Ciliés Thigmotriches (*Thigmotricha* Ch. Lw.) VI. Sur les genres „*Ancistruma*”, „*Ancistrina*” et les genres voisins. Acta. Parasit. Pol. 7, 215—247.
- Thompson J. 1958: Tetrahymenal ciliary organelles in the buccal cavity of *Cyclidium glaucoma*. J. Protozool. 5 (Suppl.) 10.

## EXPLICATION DES PLANCHES I—II

1: *Cyclidium citrullus*, vue du côté ventral

2: Vue du côté dorsal

3—5: Première phase de la morphogénèse — les cinétosomes des cinéties stomatogènes se divisent et divergent

6—8: Deuxième phase de la morphogénèse — les cinéties stomatogènes se fondent en bandes irrégulières, qui s'étendent sur presque toute la longueur du corps (la succession probable: 8, 6, 7).

9—11: Troisième phase de la morphogénèse — le champ anarchique de cinétosomes se divise en deux parties, la supérieure et l'inférieure. Les bandes divergent, formant le contour de l'AZM futur (la succession probable: 9, 11, 10).

12—13: Quatrième phase de la morphogénèse — le côté droit du champ anarchique forme l'arc de l'UM et le gauche — trois stries horizontales

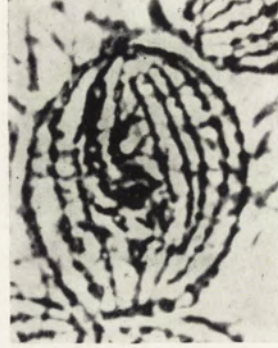
14: Cinquième phase de la morphogénèse — les stries horizontales reproduisent les trois membranelles. Le corps est déjà fort aminci







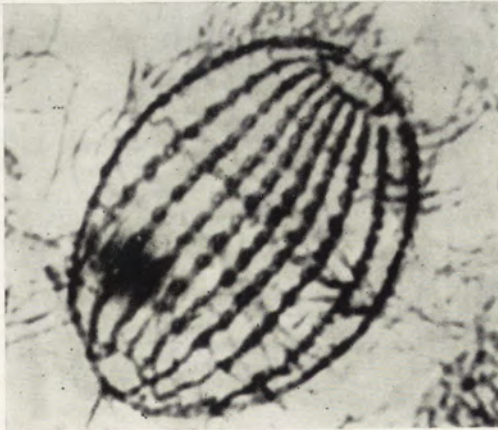
1



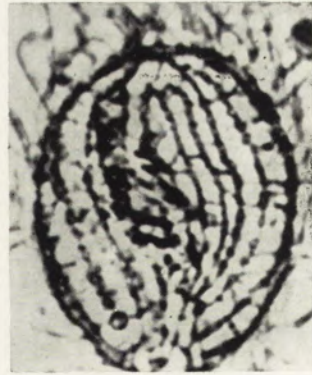
3



4



2



5

A. Czapik

auctor phot.



6



7



8



9



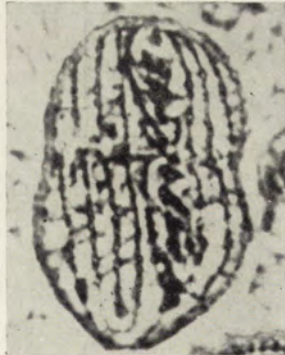
10



11



12



13



14

A. Czapik

auctor phot.

Department of General Biology of the M. Nencki Institute of Experimental Biology,  
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3.

Jerzy SIKORA

## Study on the parasitic ciliate *Steinella uncinata* (Schultze)

Badania nad pasożytniczym orzęskiem *Steinella uncinata* (Schultze)

The *Astomata* ciliates of the family *Haptophryidae* Cépède 1923 present a remarkable object of study because of some interesting problems of their structure, parasitic life and their position in the rather polyphyletic group of *Astomata*.

In the present study an attempt was made to reveal the specificity of the ciliary system of *Steinella uncinata* (Schultze, 1851).

The ciliate was described by Schultze 1851 as *Opalina uncinata*, the parasite of the Baltic turbellarian *Planaria ulvae* (*Procerodes ulvae* Oersted). The author gave a rather general description of the animal. He mentioned the contractile canal, two hooks of different size in the anterior part of the body and a bright spot found sometimes in the posterior part. That spot was recognized by him as the macronucleus only in 1880—1882. Then the name *Opalina uncinata* was replaced by *Hoplitophrya uncinata* and the animal was finally placed in the *Ciliata*.

The subsequent authors introduced nothing of essentially new to our knowledge of this ciliate. Cépède 1910 in his extensive monograph collected all the data concerning it and gave another generic name — *Steinella*. Bishop 1928 and Bush 1934 placed it in the subfamily *Steinellinae* within the family *Haptophryidae* Cépède 1923. Lom 1959 included the genus *Steinella* into the subfamily *Lachmanellinae* Cépède 1923 of the family *Haptophryidae* Cépède 1923.

The research was carried out in the Zoology Department of the University of Warsaw under the guidance of prof. dr. Z. Raabe to whom the author wishes to express his sincere thanks for his help and protection.

### Occurrence

*Steinella uncinata* was found in the branched alimentary system of the sea-water turbellarian *Procerodes ulvae* Oersted. The host with the parasite were collected in the bay of Puck near the shore of the Hel peninsula, and in the littoral waters of Ustka. The ciliate is a specific parasite of *Procerodes*

*ulvae*, which is a constant component of the *Mytilus edulis* complex. It occurs mostly in sandy or pebbled bottom and also on the surface of posts near the shore, on the depth of 30—100 cm beneath the surface of water. Deficiency of salt in water seems to be the factor limiting the distribution as well of *P. ulvae* as of *S. uncinata*. Salinity below approx. 7‰ seems to exclude both host and parasite.

The extensity of infection was 32% during the period July 27th — September 28th 1958. Intensity of infection: in most host individuals 1 or 2 parasites were present. The highest number of parasite stated in one turbellarian was 6 individuals (data from the bay of Puck). The intensity of infection seems to be higher in more favorable oxygen supply as it was observed in Ustka in July till September 1959.

### Methods

The parasites were produced from the body of the turbellarian after having dissected it with needles in a drop of water on a microscopic slide. In the mixture of the host body fluid and well water it was possible to keep the ciliate alive for 30—60 min. in a humid chamber.

For observation as well fresh as fixed material was used and studied under microscope using also the phase contrasting apparatus. As vital stain neutral red and the aqueous solution (1:1 000 000) of Janus green B, for fixed material (after Schaudin's fixative): iron haematoxylin of Heidenhain, acid haemalaun of Mayer, Giemsa's trichrom stain, silver nitrate impregnation following the dry method of Klein were applied.

### General aspect of the body

The body of *Steinella* is elongate (the average length being 260  $\mu$ ) flattened dorso-ventrally. No oral opening. In the anterior region the characteristic sucker is formed by the whole anterior part of the body including the depression of the ventral aspect and the convexity of the dorsal. The anterior region bearing the sucker is separated from the rest by a more or less expressed constriction. On the convex side of the sucker two cytoskeletal hooks of unequal size protrude. Posteriorly to the constriction — called sometimes the neck — the body is more depressed and ellipsoidal in cross section. Its width being 90  $\mu$  behind the neck is gradually tapering posteriorly. Cilia are regularly distributed over the whole body except for the thigmotactic surface of the sucker. The ciliature of the sucker is not more dense on the periphery but in the area around the hooks strong and long cilia are present, whereas the cilia of the concave surface of the sucker are short.

As a rule the macronucleus and micronucleus are in the central part of the body but sometimes they take a more anterior or posterior position near the extremes of the body. All along the dorsal aspect of the body, in the cytoplasm under the pellicle, runs the contractile canal with two outlet openings on the anterior and posterior border of the body respectively. The pellicle is elastic. The ectoplasm layer is thin, non-vacuolized in contrast

to the vacuolized — especially in the macronuclear zone — endoplasm. The anterior part shows a rather poor vacuolization. The transverse division is homothetogenic. Conjugation was not observed. Movement is rather rapid, spiraling to the left in relation to the long axis of the body.

### Orientation of the body

As we have to do with a definitely specialized parasitic form, astomatous and dissimetric, serious difficulty arises in determining the regular orientation of its body in agreement with the Chatton et Lwoff's 1949 suggestion. Therefore in the present study the region with sucker and hooks is assumed to be the anterior and the opposite — the posterior part of the body.

The axis and the polarity of the body are defined by division because the course of ciliary rows is longitudinal and the division furrow is perpendicular to it.

The body axis and the anterior and posterior ends in the dividing individual are defined by the thigmotactic area and the hooks. They both arise „de novo” in the opisthe whereas the proter receives the sucker and the hooks of the pre-division individual. The reorganization of the cytoskeletal and thigmotactic apparatus after division was not observed.

The contractile canal is running along the long axis under the surface which is considered the dorsal surface of the body. The surface with the sucker and hooks is assumed to be the ventral (after Chatton et Lwoff 1949).

The more precise definition of the dorsal and ventral side is based on the pattern of the silverline system. The apical pool forms a crescent-shaped unciliated area. The spiny ends of this structure are orientated posteriorly. The ciliary rows bordering its anterior and posterior edge meet at both sharp ends of the crescent, and run joint towards the posterior pool. The area comprised between those two ciliary rows on the surface — which is functionally ventral — defines exactly the extension of the morphologically ventral surface. All the rest is morphologically dorsal.

### Ciliary system

As to the author's knowledge *Steinella uncinata* has never been treated with the technique of silver nitrate impregnation. Application of this method to *Steinella* presents difficulty.

The Klein's dry procedure of ciliary system impregnation proved to be effective when applied as follows: a slide with the dried smear of the ciliate culture should be rinsed in distilled water several times to remove any mineral salt of the sea water; then dried again, treated with silver nitrate in sunlight, rinsed in distilled water, dried again and embedded in Canada balsam. The impregnated system consists of fibres and of structures containing basal granules in a common envelope. Their size is 0.35—0.75  $\mu$ . The spherical basal granules are usually situated at the opposite ends of the common envelope which they fill up almost thoroughly. It may be assumed

that they are really two basal granules in a common sheath because the argentophil fibrils which join them independently from the position of the ellipsoidal sheath, in all cases reach the more narrow pole just in the place where the basal granule is situated. Usually those fibrils join the longitudinal argentophil fibrils in the shortest way. The distance between the argentophil fibrils is  $0.75\text{--}1.2\mu$  and that between the basal granules being  $0.75\text{--}1.5\mu$  (Fig. 1 B and Pl. I 3).

In this way the kineties have the shape of ladders with two granules as rungs in a common sheath. The rungs of neighbour ladders are alternating.

The number of basal granules varies from 120 to 130. On the functionally

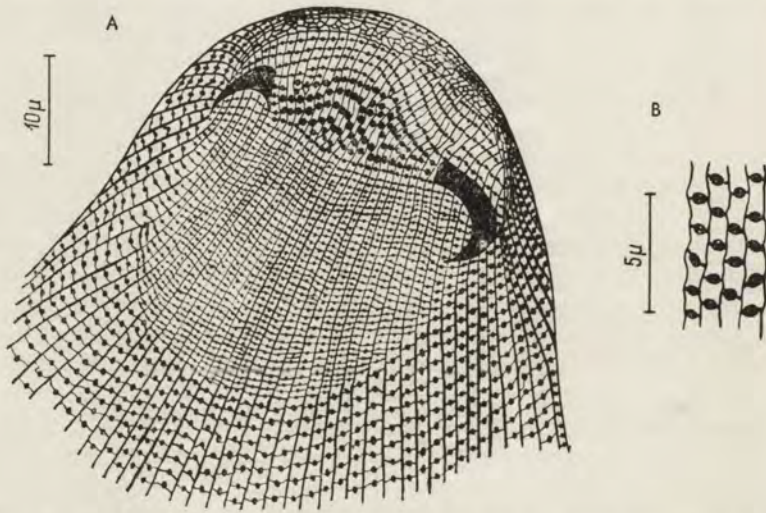


Fig. 1. A. Silverline system and hooks on the functionally ventral surface. B. Fragment of the silverline system

dorsal side, 70—80 rows originating from the anterior edge of the unciliated area, and about 25—30 from the posterior one are running. The latter rows extend over the functionally dorsal side along the right edge of the body. The functionally ventral surface has a lower number of ciliary rows: about 45—50, but about 20 rows are passing from the morphological dorsal side over the left edge of the body and in this way are also present on the ventral side (Fig. 2 A, B). All the rows of the basal granules join in the anterior part of the body in the crescent-shaped apical pool which lies on the physiological ventral surface, on its anterior edge. The apical pool is bordered by a fibre which collects all the longitudinally running kineties. The apical pool itself shows an irregular net of fibrils. Those fibrils which reach the peripheral fibre of the apical pool meet the joining points of the longitudinal fibre of the body (Fig. 1 A). The structure of the silverline system is different on the concave aspect of the sucker of which the apical pool is the anterior border. In front of the anterior prominence the rows of ciliary granules are initially normal but their transverse rungs are situated on the same level,

not alternating as they are on the remaining parts of the body. Rows of ciliary granules — joining occasionally — extend upon the prominent part of the sucker. Here about 45 very big structures are observed each of them comprising 2 basal granules, from which long and strong cilia (already mentioned above) are originating (Pl. I 1, 2). Posteriorly to this structure the remaining part of the sucker is covered by an area of very small basal gra-

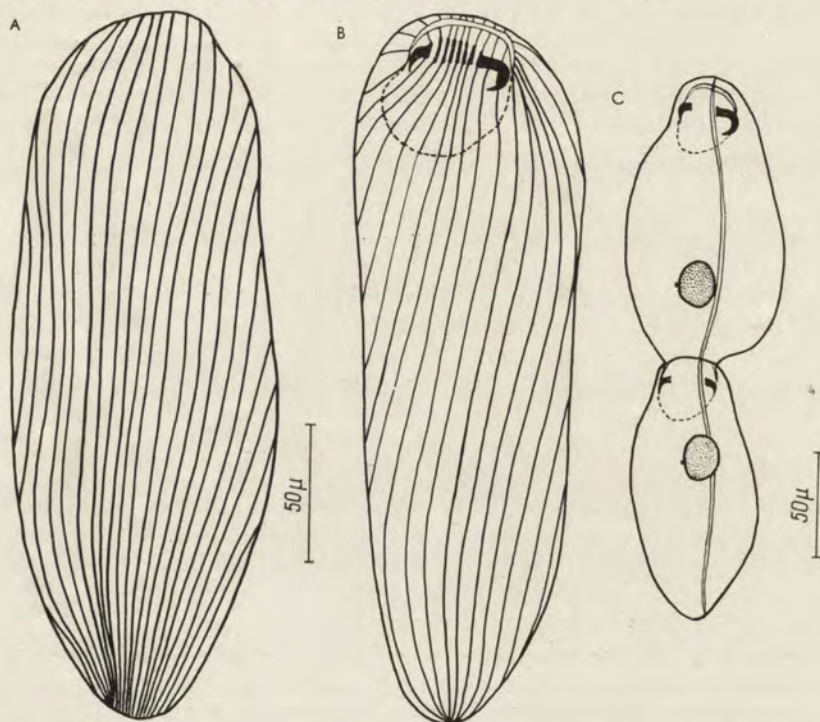


Fig. 2. Diagram of the course of basal granules rows (every 4th row is represented), on the functionally dorsal side (A) and on the functionally ventral side (B); thigmotactic surface is shown by interrupted line. C. Diagrammatic drawing of division, showing: the longitudinal contractile canal, macronuclei, micronuclei and the thigmotactic surface of the daughter individuals

nules. The confluence of posterior rows is essentially similar to that described above. It is very small and indistinct lying just on the posterior edge of the body. This confluence forms also an apical pool covered with a network of fibres. Superficial structures accompanying the outlet of the contractile canal were not observed.

#### The clinging apparatus

Besides the sucker which is a thigmotactic organ, *S. uncinata* has two clinging apparatus. These are the cytoskeletal hooks of unequal size and of different shape (Fig. 1 A). They are rather plainly seen in the living individual. For examination of hooks in fixed material, iron haematoxylin of Heiden-

hain, Giemsa's staining and impregnation with silver nitrate were applied. Hooks are round in cross section, the left one is bigger and crooked, the right which is smaller, is spine-shaped and crooked in its basal part. They protrude sideways from the sucker prominence which is situated excentrically, nearer the anterior edge. The distance between the external edge of the hooks is always 28—29  $\mu$ . It is a striking fact that this distance is constant as well in the opisthe as in the proter. In the opisthe the hooks are initially very small; their increase in size is the effect of a gradual sliding away of the pellicle from their surface towards the prominence, and in this way, hooks are getting gradually outside the pellicle. This observation is confirmed by the pattern and the course of the rows of the basal granules on the sucker.

The sucker is an emergence organ of clinging. It is not bordered by any crown of cilia but has only a small condensation of very strong and long cilia on the prominence bearing the hooks. Before the ciliate is anchored, those cilia perform intense movements seen as circular waves. The mechanism of anchoring looks probably as follows: the animal approaches the object acting with the whole ciliature of its body; as soon as it gets adhered to the object with edges of its sucker, the strong central cilia start working intensely and push away a part of water from the concavity of the sucker, producing the hypotension in the space between the object and the surface of the ciliate.

#### Nuclear apparatus

As a rule macronucleus and micronucleus which is placed on the macronuclear surface occupy in trophonts the central position. The number of micronuclei varies from 1 to 3. Macronucleus is ellipsoidal measuring  $50 \times 23 \mu$ . The long diameter of macronucleus lies according the long axis of the cell.

In trophont, the macronucleus when stained with iron haematoxylin is granulated; the grains stain black and are surrounded by a stainless sphere. Micronucleus as a rule stains black, is spherical (its diameter being 2.5  $\mu$ ), surrounded by a lentiform sphere, situated on the periphery of the macronucleus apex on the level of its longer axis.

#### Division

The typical homothetigenic division is the only form of reproduction which could be observed in *Steinella uncinata*. Divisions are probably synchronous since they are often observed in all the individuals of one host. Before division the dimensions  $350 \times 120 \mu$  are in most cases attained.

The division of the body is preceded by the mitotic division of one of the micronuclei on the surface of macronucleus. The subsequent behaviour of the remaining micronuclei was not followed. After the division of micronucleus, the two daughter micronuclei migrate to the opposite sharp ends of macronucleus and initiate the amitotic division of macronucleus which gradually constricts and divides into two parts. Simultaneously when the macronucleus still keeps its contact with the constriction, the ciliate body begins to constrict just on the level of the macronuclear constriction, and the orga-



nization of the opisthe concerning the big basal granules and hooks starts on the ventral side of the opisthe closely behind the constriction of the body. The anterior apical pool of the opisthe is the most persisting trace of union with the proter (Fig. 2 C).

In the course of division the kineties of the left and right edge disjoin first; those of the functional dorsal and ventral surface persist the longest.

Separation of the opisthe from the proter is preceded by the complete isolation of the macronucleus. For some time the post-division individuals — measuring  $160 \times 60 \mu$  show an abnormal position of their macronuclei and micronuclei.

The contractile canal is dividing simultaneously with the division of the whole body.

The proter is usually somewhat bigger than the opisthe.

The reorganization of the thigmotactic apparatus and of the hooks have not been followed in this study.

#### Discussion

The characters of *Steinella uncinata* agree with all the definitions of the family *Haptophryidae* Cépède 1923, as established by Lom 1959: absence of mouth, numerous basal corpuscles, body in most cases elongate, the anterior region of the body flattened containing a thigmotactic area, macronucleus ovoid, one or several micronuclei, division direct or catenular.

Lom 1959 placed *Steinella uncinata* in the subfamily *Lachmanellinae* Cépède 1923 which was described by him as follows: presence of the thigmotactic surface on the flattened ventral side of the anterior part of the body, the cytoskeletal hooks, the long contractile canal, the direct division, parasitism in *Turbellaria*.

According to Lom 1959 this family includes the following genera: 1. genus *Lachmanella* Cépède 1923 represented by *L. recurva* (Claparède and Lachman, 1858) — with one hook, 2. genus *Steinella* Cépède 1910 represented by *S. uncinata* (Schultze, 1851) — with 2 hooks, 3. genus *Annelophrya* Lom 1959 represented by *A. spheronucleata* (Georgevith, 1948) — with a crown of hooks on the adhesion surface.

The distinctive character of the subfamily *Lachmanellinae*, as compared with the subfamily *Haptophryinae* Cépède 1923 and *Sieboldiellinae* Cépède 1923 is according to Lom 1959 the presence of cytoskeletal hooks. Yet in his juxtaposition of the subfamily characters Lom 1959 omitted the silverline system of the subfamily *Lachmanellinae* representatives. The study of this structure may introduce much light to the phylogenetic relations within the family *Haptophryidae*. Perhaps just the parasitism exerted the fundamental influence creating a similar pattern of structure in the phylogenetically remote forms.

The exact examination of the silverline system in the representative forms till now considered as belonging to the *Haptophryidae* Cépède 1923 would enable to find the real phylogenetic relations within this group.

### Summary

The structure of the silverline system — not described till now — in *Steinella uncinata* (Schultze, 1851) was studied. The structure and function of some cellular organella as the clinging apparatus of the sucker, the pulsatile canal, etc. was described. The appearance of the nuclear apparatus in the interphase and during division was described.

It was stated that *Steinella uncinata* is a specific parasite of the alimentary canal of the Baltic turbellarian *Procerodes ulvae* Oersted. The species studied is an example of an organism highly adapted to the parasitic life, and therefore its most specific character of a taxonomic value seems to be the structure of its silverline system.

### STRESZCZENIE

Badano nieznaną dotychczas budowę układu srebrochłonnego wymocznika *Steinella uncinata* (Schultze, 1851). Opisano budowę i funkcjonowanie szeregu organellów komórkowych: aparatu czepno-przysawkowego, kanału tętniącego i in. Opiszano wygląd aparatu jądrowego w interfazie i podczas podziału. Stwierdzono, że *Steinella uncinata* jest specyficznym pasożytem przewodu pokarmowego wirka bałtyckiego *Procerodes ulvae* Oersted.

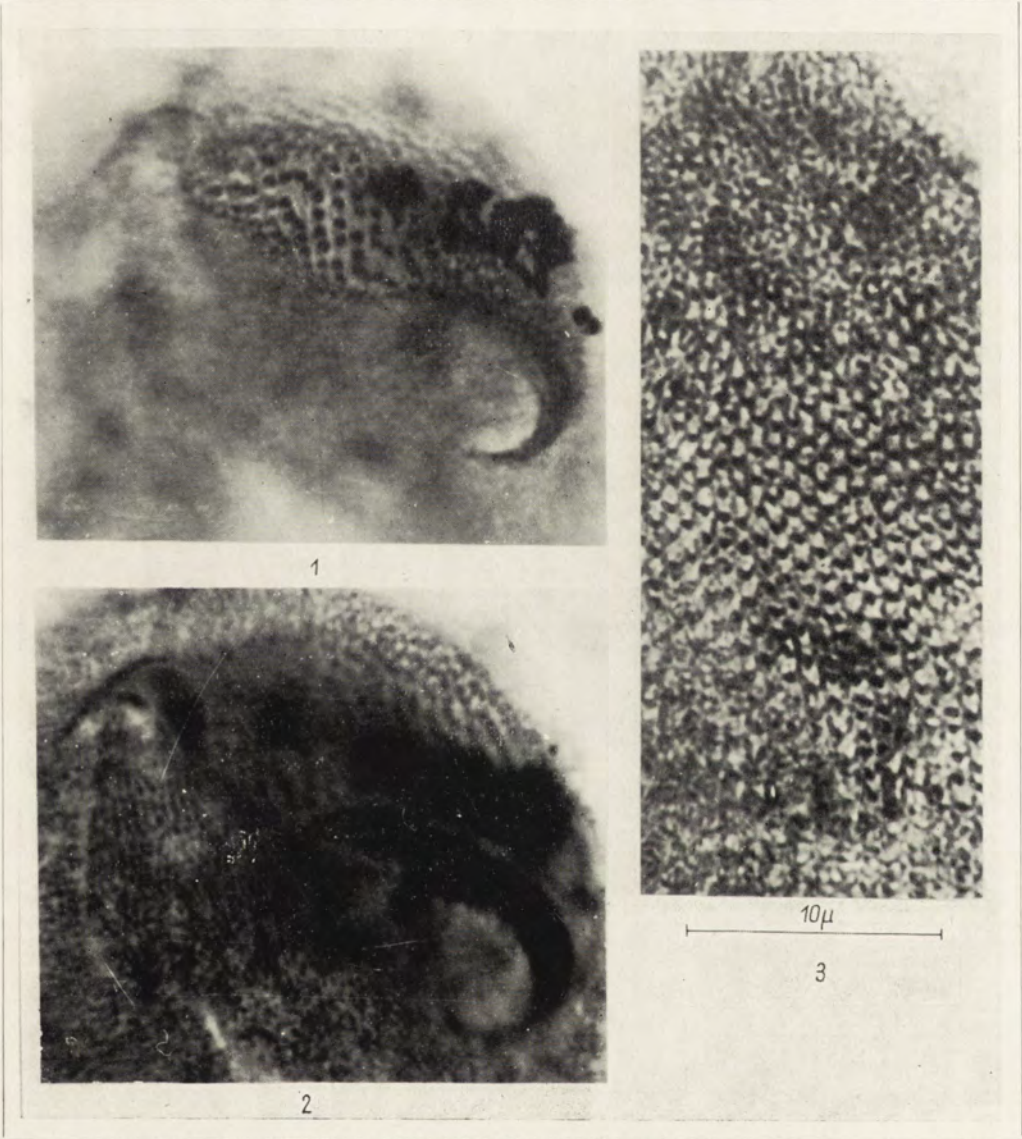
Gatunek rozpatrywany jest przykładem organizmu o daleko posuniętym przystosowaniu do życia pasożytniczego i dlatego wydaje się, że najbardziej specyficzną cechą o charakterze systematycznym może być budowa jego układu srebrochłonnego.

### REFERENCES

- Bishop A. 1928: Notes upon *Sieboldiellina planariarum* (Siebold) a ciliate parasite of *Planaria torva*. Parasitology Cambridge 18, 187—194.
- Bush M. 1934: The morphology of *Haptophrya michiganiensis* Woodhead, an astomatous Ciliate from intestinal tract of *Hemidactylum secutum* (Schlegel). Univ. Calif. Publ. Zool. 39, 251—276.
- Cépède C. 1910: Recherches sur les Infusoires astomes: anat., biol., ethol., paras., system. Arch. Zool. Exp. Gén. (sér. 5) 3, 341—609.
- Cépède C. 1923: Note taxonomique sur les Infusoires astomes. (*Haptophryidae* Cépède nom. nov. pro *Discophryidae* Cépède 1910). Bull. Soc. Zool. France 48, 105—108.
- Chatton E. et Lwoff A. 1949: Recherches sur les Ciliés Thigmotriches. Arch. Zool. Exp. Gén. 86, 169—253.
- Lom J. 1959: Beiträge zur Kenntnis der parasitischen Ciliaten aus Evertebraaten IV. Arch. Protistenk. 104, 133—154.
- Schultze M. 1851: Beiträge zur Naturgeschichte der Turbellarien. Greifswald.

### EXPLANATION OF THE PLATE I

- 1: Thigmotactic surface of *Steinella uncinata*. Superior optical section on the level of the surface of the hooks bearing convexity
- 2: Optical section of the more profound layers of the thigmotactic surface. Basal part of hooks is seen
- 3: Fragment of the pellicle with silverline system



J. Sikora

auctor phot.



Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Малкина 32

Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR,  
Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32

И. Б. РАЙКОВ

I. B. RAIKOV

## Ядерный аппарат равноресничных инфузорий *Geleia orbis* Fauré-Fremiet и *G. murmanica* Raikov

The nuclear apparatus of the holotrichous ciliates *Geleia orbis*  
Fauré-Fremiet and *G. murmanica* Raikov

Инфузории рода *Geleia*, описанного Калем (Kahl 1933), принадлежат к типичным представителям интерстициальной фауны песка морской литорали (Fauré-Fremiet 1950, Fjeld 1955, Dragesco 1960, Райков 1960 и 1962). Всего в настоящее время известно 17 видов этого рода. По-видимому, все они обладают ядерным аппаратом примитивного типа, который состоит из 2-х или большего числа диплоидных макронуклеусов и одного или нескольких микронуклеусов. Все авторы, касавшиеся цитологии *Geleia*, единодушно отмечают малое содержание ДНК в макронуклеусах разных видов этого рода (Fauré-Fremiet 1950, Fjeld 1955, Райков 1959a, Dragesco 1960). Подробно изучены до сих пор ядра только одного вида, *Geleia nigriceps* (Райков 1959a); нам удалось показать, что макронуклеусы этой формы неспособны делиться и возникают при каждом делении особи заново за счет микронуклеусов, подобно диплоидным примитивным макронуклеусам *Tracheloraphis* (Райков 1958), *Loxodes* (Fauré-Fremiet 1954, Райков 1959b) и *Remanella* (Райков 1963). Вместе с тем макронуклеусы *G. nigriceps* оказались физиологически весьма активными, что доказывается выделением из них в цитоплазму особых сферул, богатых РНК. Задачей настоящей работы явилось сравнительное изучение ядерного аппарата других видов *Geleia* с целью выяснить общие особенности макронуклеусов примитивного типа, находящихся на филогенетической стадии „первичной дифференцировки“ (Райков 1963) и не вступивших еще в ходе эволюции в стадию полиплоидизации.

### Материал и методика

Работа проводилась на двух близких друг к другу крупных видах *Geleia* — *G. orbis* Fauré-Fremiet, 1950 и *G. murmanica* Raikov, 1962.<sup>1</sup> Морфологические описания *G. orbis* даются также Фельдом (Fjeld 1955) и Дражеско (Dragesco 1960).

<sup>1</sup> В статье по инфузориям Баренцова моря (Райков 1960) мы ошибочно идентифицировали эту форму с *G. orbis*. В более поздней работе (Райков 1962) *G. murmanica* выделяется в самостоятельный вид и дается его дифференциальный диагноз по сравнению с *G. orbis*.

Материал по *G. orbis* собран в июне — июле 1961 г. в песке литорали Белого моря (Северная бухта о. Ряшкова, в пределах Кандалакшского заповедника). Материал по *G. turmanica* собирался летом 1958 и 1960 гг. на песчаном Дальнем пляже Дальнезеленецкой бухты Баренцова моря (работа велась на базе Мурманского морского биологического института). На Белом море *G. turmanica* также встречалась, но весьма редко.

Небольшая часть инфузорий фиксировалась смесью Ниссенбаума (Nissenbaum 1953) и изучалась на тотальных препаратах. Основная масса материала фиксировалась сулемой с уксусной кислотой или смесью Ценкера (с формалином или уксусной кислотой), заливалась в парафин и исследовалась на серийных срезах толщиной 5—10 мк. Реже использовались и другие фиксаторы (Буэна, Серра, Шампи). Тотальные препараты окрашивались чаще всего гемалауном. Часть срезов окрашивалась железным гематоксилином Гейденгайна; ДНК определялась по Фельгену, РНК — окрашиванием срезом метиловым зеленым—пиронином, толуидиновым синим или галлоцианином. Контрольные препараты обрабатывались при этом рибонуклеазой (1 мг/мл, 37°, 3 часа) или 1N HCl (60°, 10 мин.). Белки окрашивались сулемовым раствором бромфенолового синего.

#### Строение и цитохимия ядер

Ядерный аппарат *G. orbis* отличается от такового *G. turmanica* главным образом по числу ядер. Строение же макро- и микронуклеусов у этих двух видов весьма сходно, что дает возможность описывать структуру ядер *G. orbis* и *G. turmanica* параллельно.

Таблица 1

Распределение изученных *G. orbis* по числу ядер и строению нуклеолярного аппарата макронуклеусов

Число ядер	Количество экземпляров			
	Только с мелкими нуклеолами в Ма	С РНК-сферами или вакуолями в Ма	Всего	Всего в процентах
2 Ма, 1 Ми	704	244	948	88.4
3 Ма, 1—4 Ми	13	9	22	2.1
4 Ма, 2—4 Ми	52	14	66	6.1
5 Ма, 2—3 Ми	3	1	4	0.4
6 Ма, 3 Ми	26	6	32	3.0
Всего	798	274	1072	
Всего в процентах	74.4%	25.6%		100%

Соотношение числа особей *G. orbis* с разным числом ядер представлено в табл. 1. Этот вид имеет чаще всего 2 макронуклеуса и 1 микронуклеус (88,4% экземпляров). Ядра лежат в средней части тела, вблизи брюшной стороны (рис. I 1). Макронуклеусы (рис. II 9 Ma), располагаются вплотную друг к другу, а микронуклеус (Mi) обычно как бы „вклинивается” между ними. Среди особей с увеличенным числом ядер чаще других встречаются индивиды с 3 макронуклеусами (рис. II 10), с 4 макро- и 2 микронуклеусами (рис. II 11), и с 6 макро- и 3 микронуклеусами (рис. II 12). В последних двух случаях происходит как бы удвоение и утроение всего ядерного аппарата, что отражается и на расположении ядер — они лежат группами по 2 макро- и 1 микронуклеусу в каждой. Интересно, что у особей с увеличенным числом ядер макронуклеусы обычно несколько мельче, чем у инфузорий с 2 макронуклеусами (ср. рис. II 9 и II 10—12).

Таблица 2

Распределение 100 экземпляров *G. turmanica* по числу макронуклеусов и строению нуклеолярного аппарата

Число макронуклеусов	Количество экземпляров		
	Только с мелкими нуклеолами в Ma	С РНК-сферами в Ma	Всего
8—10	10	1	11
11—13	13	4	17
14—16	17	7	24
17—19	20	2	22
20—22	10	2	12
23—25	5	2	7
26—28	3	1	4
29—32	2	1	3
Всего	80	20	100

Число ядер у *G. turmanica* варьирует в весьма широких пределах — от 3 до 32 макронуклеусов и от 3 до 16 микронуклеусов. Как видно из табл. 2, преобладают особи с 10—20 макронуклеусами. Ядра находятся, как и у *G. orbis*, в средней части тела у брюшной стороны (рис. I 2). Обычно они лежат группами по 2 макро- и 1 микронуклеусу в каждой (рис. III 23). Однако такое правильное расположение ядер имеется далеко не всегда (рис. I 8, III 24).

Микронуклеусы обоих видов имеют дисковидную форму, диаметр 3—3,5  $\mu$  (рис. II 9 и III 23 Mi). Они умеренно фельген-положительны (рис. II 13), галлоцианином окрашиваются одинаково до и после удаления РНК (рис. II 14 и II 15). Метиловый зеленый—пиронин окрашивает их в чистый бледно-зеленый цвет. Очевидно, микронуклеусы содержат ДНК, но не содержат РНК. Реакция на белки в микронуклеусах обоих видов весьма интенсивна, причем окрашивается как их оболочка, так и содержимое (рис. II 16).

Макронуклеусы *Geleia orbis* и *G. turmanica* имеют сферическую форму, диаметр около 8—11  $\mu$ . Внутри макронуклеус заполнен большим количеством мелких нуклеол (рис. II 9, н). При окрашивании по Фельгену ДНК в макронуклеусах почти не обнаруживается — различимы лишь несколько мелких, слабо фельген-положительных гранул на периферии ядра (рис. II 13). Окрасить хроматин макронуклеуса метиловым зеленым не удается совершенно. Толуидиновый синий или галлоцианин (после удаления РНК, рис. II 15) также не выявляют ДНК в макронуклеусах. Из этих данных следует, что макронуклеусы *G. orbis* и *G. turmanica* очень бедны ДНК, подобно диплоидным макронуклеусам некоторых других низших инфузорий (*Tracheloraphis*, *Loxodes*, *Remanella*). Они резко отличаются от богатых ДНК полиплоидных макронуклеусов высших инфузорий.

Нуклеолы макронуклеусов обоих видов (рис. II 9 и III 23, н) имеют характерную „кольцевидную” форму (т.е. внутри каждой нуклеолы имеется светлая вакуоль). Диаметр нуклеол — около 1  $\mu$ ; число их в одном макронуклеусе не поддается точному подсчету. Во всяком случае, оно больше 50. Нуклеолы равномерно распределены по всему объему макронуклеуса. Они фельген-отрицательны (рис. II 13), базофильны (рис. II 14), причем их базофилия снимается обработкой рибонуклеазой или 1N HCl при 60° (рис. II 15). Для нуклеол характерно высокое содержание белка (рис. II 16). По-видимому, они состоят в основном из рибонуклеопротеидов.

Центральная, светлая часть каждой нуклеолы ни одним красителем электроно не окрашивается; по-видимому, это просто вакуоль с жидким содержимым.

Оболочка макронуклеуса РНК не содержит (рис. II 14). Она дает положительную реакцию только на белок (рис. II 16). Цитохимические особенности макронуклеусов *G. turmanica* полностью совпадают с таковыми *G. orbis*.

Такое строение имеют макронуклеусы у 74% особей *G. orbis* (табл. 1) и у 80% особей *G. turmanica* (табл. 2). Остальная часть изученных экземпляров обнаружила циклические изменения нуклеолярного аппарата макронуклеусов, связанные с выходом РНК из ядер в цитоплазму. Эти явления подробнее изучены у *G. orbis* и описываются ниже на материале этого вида.

#### Нуклеолярный цикл

Изменения нуклеолярного аппарата всегда начинаются одновременно в обоих макронуклеусах особи и протекают в них параллельно. Если имеется более двух макронуклеусов, то нуклеолярные изменения охватывают все ядра.

Процесс начинается с увеличения одной нуклеолы в каждом макронуклеусе. Центральная вакуоль в ней обычно перестает быть видимой, и увеличенная нуклеола приобретает вид ярко красящейся пиронином (рис. III 17) и другими основными красителями сферулы. Контроль с рибонуклеазой показывает, что базофилия сферулы обусловлена РНК. Сферула содержит также значительное количество белка. Рост сферулы продолжается (рис. III 18), пока она не достигнет диаметра около 6  $\mu$  (рис. I 3 и III 19). Мелкие „кольцевидные” ядрышки оттесняются при этом к периферии ядра; их базофилия значительно ослабевает (рис. I 3, III 19, III 24). Происходит как бы концентрация большей части РНК макронуклеуса в сферуле и обеднение ею мелких нуклеол.



В дальнейшем, по-видимому, происходит растворение сферул; на их месте возникают большие базофильные вакуоли, содержащие также и белок (рис. III 20). Окрашивание содержимого вакуоли часто асимметрично, базофильное вещество смещено к одной ее стороне (рис. I 4). Как видно на этой фотографии, вакуоль обычно непосредственно соприкасается с ядерной оболочкой; именно в этом месте ее содержимое наиболее базофильно.

Следующая, критическая стадия нуклеолярного цикла была найдена всего один раз (рис. I 5). На фотографии видно, что мембрана макронуклеуса прорывается в том месте, где под ней лежит вакуоль, и содержимое последней изливается в цитоплазму. Таким образом, происходит передача рибонуклеопротеидов, синтезированных нуклеолярным аппаратом макронуклеусов, из ядер в цитоплазму.

После этого процесса отверстие в ядерной оболочке снова замыкается. Вакуоли в макронуклеусах, излившие свое содержимое, уже более не базофильны и имеют вид прозрачных пузырьков (рис. I 6 и III 21). Они постепенно претерпевают обратное развитие, уменьшаются в размерах (рис. I 7 и III 22) и, наконец, совершенно исчезают. Одновременно базофилия мелких „кольцевидных” нуклеол снова начинает нарастать.

Изменения нуклеолярного аппарата *G. orbis* не удается связать с циклом деления инфузории. Макронуклеусы делящихся особей могут находиться на любой стадии развития сферул (рис. IV<sup>1</sup> 26) и вакуолей (рис. IV 25). По-видимому, циклы нуклеолярной активности происходят периодически, независимо от деления самой инфузории.

Как видно из табл. 1, процентное соотношение особей *G. orbis*, не обнаруживающих нуклеолярной активности, и особей со сферулами или вакуолями приблизительно одинаково у форм с 2 макро- и 1 микронуклеусом (74% и 26%) и форм с увеличенным числом ядер (76% и 24%). Примерно таково же соотношение особей без сферул в макронуклеусах и особей со сферулами (80 и 20%) у *Geleia turmanica* (табл. 2).

Морфологическая картина развития РНК-сферул у *G. turmanica* (рис. III 24) практически ничем не отличается от описанной выше для *G. orbis*. Они всегда развиваются одновременно во всех макронуклеусах одной особи; их появление также не удается связать с циклом деления инфузории.

### Деление

Мы располагаем, к сожалению, лишь неполными данными по делению *G. orbis* и *G. turmanica*. Последовательность ядерных изменений при делении этих двух видов различна.

*Geleia orbis* (рис. IV 25—27).

У этого вида ядерные процессы протекают синхронно во время плазмотомии; их последовательность строго фиксирована. По-видимому, это связано с малым числом ядер. Ход ядерных процессов здесь совершенно тот же, что при делении *Geleia nigriceps*, *Loxodes rostrum*, *Remanella rugosa* и *R. granulosa* (Райков 1959а, 1959б, 1963). Все эти формы имеют одинаковое с *G. orbis* число ядер — 2 макронуклеуса и 1 микронуклеус.

Незадолго до появления перетяжки цитоплазмы микронуклеус *G. orbis* делится (митоз наблюдать не удалось). В результате получается стадия с 2 макро-

и 2 микронуклеусами (рис. IV 25). Как и у других инфузорий с диплоидными макронуклеусами, последние неспособны к делению. Происходит распределение двух имеющихся макронуклеусов между дочерними особями: макронуклеусы расходятся в противоположные стороны, сопровождаемые каждый одним микронуклеусом. Вскоре микронуклеус будущей дочерней особи делится снова (рис. IV 26). Один из двух микронуклеусов каждой дочерней особи еще до разделения цитоплазмы превращается в зачаток второго макронуклеуса (рис. IV 27). Тем самым восстанавливается нормальное число ядер. Следствием такого типа деления является то обстоятельство, что два макронуклеуса любой особи *G. orbis* всегда имеют разный возраст: один из них получен от материнской особи, а другой образовался из микронуклеуса в ходе последнего деления. Молодой макронуклеус часто бывает несколько мельче старого (рис. II 13, 14; III 17, 18, 22).

*Geleia murmanica* (рис. IV 28/30).

Как и у других многоядерных инфузорий с примитивными макронуклеусами (*Tracheloraphis margaritatus*, *T. dogieli*, *Loxodes magnus*), ядерная реорганизация происходит у *G. murmanica* несинхронно, в промежутке между двумя делениями особи. Во время деления цитоплазмы имеющиеся в наличии макро- и микронуклеусы распределяются между дочерними особями, не испытывая никаких изменений (рис. IV 28). Как и у предыдущего вида, макронуклеусы *G. murmanica* никогда не делятся. Уменьшение их числа в результате их распределения при делении цитоплазмы компенсируется тем, что в промежутке между 2 делениями инфузории часть микронуклеусов образует зачатки макронуклеусов (рис. IV 29, 30, зм). Микронуклеусы, по-видимому, размножаются путем митозов; однако наблюдать эти митозы в нашем материале не удалось.

Наряду с образованием новых макронуклеусов происходит, по-видимому, и дегенерация старых, отслуживших свой срок макронуклеусов. Они увеличиваются в размерах, деформируются (рис. IV 30, дм); нуклеолы дегенерирующих макронуклеусов менее базофильны, чем в нормальных ядрах, и имеют неравномерную величину.

Развитие зачатков макронуклеусов идет у *G. orbis* и *G. murmanica* одинаково. На ранней стадии зачатки, диаметром около 4  $\mu$ , еще явственно фельген-положительны (рис. IV 29, зм). Они содержат мелкие хроматиновые элементы палочковидной формы (хромосомы?). В дальнейшем развитии зачатков не происходит ни синтеза ДНК, ни эндомитотического удвоения хроматиновых элементов. Очевидно, макронуклеусы *Geleia* остаются диплоидными.

В зачатках макронуклеусов диаметром около 6—8  $\mu$  (рис. IV 27, 30) хроматиновые элементы еще окрашиваются метиловым зеленым; зачатки этой стадии еще не содержат нуклеол, лишены РНК и не окрашиваются пиронином (рис. IV 30, зм). С появлением нуклеол хроматиновый материал зачатка еще более маскируется. Молодые макронуклеусы содержат меньшее число нуклеол, чем старые (рис. III 23). Однако, в них уже могут образовываться РНК-сферулы, как и в старых ядрах (рис. III 24).

#### Обсуждение

Приведенные выше данные показывают, что ядерный аппарат *G. orbis* и *G. murmanica* принадлежит к тому же типу строения, что и ядерные аппараты *Tracheloraphis*, *Geleia nigriceps*, *Loxodes* и *Remanella* (Райков 1958, 1959а, 1959б, 1963). Важнейшими особенностями этого типа строения ядер являются:

малое содержание ДНК в макронуклеусах, вероятно, связанное с их диплоидностью; неспособность макронуклеусов к делению и наличие реорганизационных процессов, приводящих к пополнению числа макронуклеусов за счет микронуклеусов при каждом делении особи. Общей особенностью диплоидных макронуклеусов можно считать также богатство их РНК и сильное развитие нуклеолярного аппарата. В деталях строения макронуклеусов наблюдается значительное разнообразие: например, *Loxodes*, *Remanella granulosa* и *Geleia nigriceps* имеют по 1 крупной нуклеоле в каждом макронуклеусе, в то время как *Tracheloraphis dogieli* и *Remanella rugosa* — по несколько нуклеол. Наибольшее число ядрышек имеют макронуклеусы *G. orbis* и *G. murmanica*.

Циклические изменения нуклеолярного аппарата, связанные с выделением в цитоплазму РНК, наблюдались ранее у *Geleia nigriceps*, *Remanella rugosa* и *R. granulosa*. Морфологически этот процесс у *G. orbis* и *G. murmanica* более сходен с таковым у *Remanella*, чем у представителя того же рода — *Geleia nigriceps*. Если у последнего вида РНК-сфера образует внутринуклеолярно и выбрасывается целиком в цитоплазму (Райков 1959а), то у *Remanella rugosa*, *R. granulosa* (Райков 1963), *Geleia orbis* и *G. murmanica* наблюдается растворение увеличенных нуклеол, образование РНК-вакуолей и выход их содержимого в цитоплазму в растворенном виде.

Такие процессы распространены и у многоклеточных; так, в клетках печени человека ядрышко прикладывается изнутри к ядерной оболочке, которая в этом месте прорывается, и содержимое внутринуклеолярной вакуоли, богатое РНК, изливается в цитоплазму (Altmann 1949). Подобные явления описаны также для других клеток млекопитающих (Hett 1937; Altmann und Meny 1952, Далмане 1959), для клеток насекомых (Hogben 1921, Teodorescu 1958), ооцитов червей (Srivastava 1952) и рыб (Yamamoto 1956) и др.

Таким образом, выделение РНК из нуклеол в цитоплазму представляет собою широко распространенное явление. Его биологическое значение состоит, вероятно, в передаче генетической информации от хромосомного аппарата через РНК к центрам белкового синтеза в цитоплазме. Это явление широко распространено среди низших инфузорий с диплоидными макронуклеусами, что указывает на высокую биохимическую активность последних. Несмотря на малые размеры макронуклеусов по сравнению с телом инфузории (ядерно-плазменное отношение здесь гораздо ниже, чем, например, у парамеций), эти ядра, очевидно, способны поддерживать нуклеопротеидный обмен в клетке на достаточно высоком уровне. Поэтому, несмотря на разнообразие в деталях нуклеолярных изменений, можно считать, что активное участие в синтезе РНК также является общей особенностью диплоидных макронуклеусов.

В отношении времени выхода РНК из макронуклеусов разные виды ведут себя по-разному. У *Geleia nigriceps* выбрасывание РНК-сферул происходит обычно перед делением, в то время как у *Remanella rugosa*, *R. granulosa*, *Geleia orbis* и *G. murmanica* этот процесс с делением связать не удается.

#### Выводы

Ядерный аппарат *Geleia orbis* состоит в норме из 2 макронуклеусов и 1 микронуклеуса; у небольшой части особей число ядер увеличено и может достигать 6 макро- и 3 микронуклеусов.

*G. murmanica* имеет 8—32 макронуклеуса и 3—16 микронуклеусов того же строения, что и у *G. orbis*.

Микронуклеусы обоих видов содержат ДНК и белки. Макронуклеусы очень бедны ДНК и по-видимому, диплоидны. Нуклеолярный аппарат макронуклеусов состоит из большого числа мелких нуклеол, содержащих рибонуклеопротеиды.

Приблизительно у 1/4 особей наблюдаются циклические изменения нуклеолярного аппарата одновременно во всех макронуклеусах: среди мелких нуклеол появляется сферула, богатая РНК, которая затем растворяется, образуя РНК-вакуоль. Содержимое вакуоли изливается в цитоплазму через отверстие в ядерной оболочке. Макронуклеусы *G. orbis* и *G. murmanica* участвуют, следовательно, в синтезе РНК цитоплазмы.

Макронуклеусы обоих видов неспособны к делению; при делении инфузории они распределяются между дочерними особями. Недостающие макронуклеусы развиваются из микронуклеусов в цикле каждого деления особи.

#### SUMMARY

The marine sand dwelling ciliate *Geleia orbis* has usually 2 macronuclei and 1 micronucleus, *Geleia murmanica* — 8—32 macronuclei and 3—16 micronuclei. The nuclear structure is alike in both species. The micronuclei contain DNA and proteins. The macronuclei are very poor in DNA, being probably diploid, and include many little nucleoli containing RNA. In some individuals, RNA-rich spherules appear in all macronuclei among the little nucleoli. Later they dissolve forming RNA-vacuoles, which pour out their contents into the cytoplasm through a transitory hole in the nuclear membrane. The macronuclei of both species never divide, being distributed among the daughter individuals at plasmotomy. The number of macronuclei becomes supplemented by transformation of micronuclei into macronuclei in the cycle of every cell division.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Altman H. W. 1949: Über die Abgabe von Kernstoffen in das Protoplasma der menschlichen Leberzelle. Zeitschr. Naturforsch. 4b, 138—144.
- Altman H. W. und Meny R. 1952: Der Funktionswechsel des Zellkerns im exokrinen Pankreasgewebe. Naturwiss. 39, 138—139.
- Далмане А. Р. 1959: О роли ядрышка в секреторном процессе в клетках желтого тела белой крысы. Тр. Инст. exper. мед. АН Латв. ССР 19, 179—183. (сборник „Вопросы морфологии и физиологии“, вып. 4), Рига.
- Dragesco J. 1960: Les Ciliés mésopsammiques littoraux (système, morphologie, écologie). Trav. Stat. Biol. Roscoff, n. sér. 12, 1—356.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Écologie des Ciliés psammophiles littoraux. Bull. Biol. France Belg. 84, 35—75.
- Fauré-Fremiet E. 1954: Réorganisation du type endomixique chez les *Loxodidae* et chez les *Centrophorella*. J. Protozool. 1, 20—27.
- Fjeld P. 1955: On some marine psammobiotic ciliates from Drøbak (Norway). With remarks on a method for quantitative studies of micropsammon. Nytt Mag. Zool. 3, 5—65.
- Hett J. 1937: Über den Austritt von Kernsubstanzen in das Protoplasma. Zeitschr. Zellforsch. 26, 239—248.
- Hogben L. 1921: Studies on synapsis. III. The nuclear organization of the germ cells in *Libellula depressa*. Proc. Roy. Soc. B. 92, 60—80.

- Kahl A. 1933: *Ciliata libera et ectocommensalia*. Tierwelt der Nord und Ostsee 23, Teil II, C. 3, 29—146.
- Nissenbaum G. 1953: A combined method for the rapid fixation and adhesion of ciliates and flagellates. Science 118, 31—32.
- (Райков И. Б.) Raikov I. B. 1958: Der Formwechsel des Kernapparates einiger niederer Ciliaten. I. Die Gattung *Trachelocerca*. Arch. Protistenk. 103, 120—192.
- Райков И. Б. 1959а: Цитологические и цитохимические особенности ядерного аппарата и деления равноресничной инфузории *Geleia nigriceps*. Цитология 1, 566—579.
- (Райков И. Б.) Raikov I. B. 1959б: Der Formwechsel des Kernapparates einiger niederer Ciliaten. II. Die Gattung *Loxodes*. Arch. Protistenk. 104, 1—42.
- Райков И. Б. 1960: Интерстициальная фауна инфузорий песчаной литорали Дальнезеленецкой бухты (Восточный Мурман). Тр. Мурманск. морск. биол. инст. 2, 172—185.
- (Райков И. Б.) Raikov I. B. 1962: Les Ciliés mésopsammiques du littoral de la Mer Blanche (URSS), avec une description de quelques espèces nouvelles ou peu connues. Cahiers Biol. Marine 3, 325—361.
- Райков И. Б. 1963: Ядерный аппарат и деление равноресничных инфузорий *Remanella granulosa* Kahl и *R. rugosa* Kahl. Вопросы морфол. и физиологии простейших (сборн. работ Института цитологии АН СССР) (в печати).
- Srivastava D. S. 1952: Nucleolus and nucleolar extrusions in the oocytes of *Lumbricus terrestris* L. La Cellule 35, 132—136.
- Teodorescu M. E. 1958: Emisiuni nucleare in citoplasma neuronilor din ganglionii nervosi de muscide in perioada nimfozei. Comun. Acad. R. P. Romina 8, 1071—1076.
- Yamamoto K. 1956: Studies on the formation of fish eggs. II. Changes in the nucleus of the oocyte of *Liopsetta obscura*, with special reference to the activity of the nucleolus. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., ser. VI 12, 375—390.

## ПОДПИСИ К ТАБЛИЦАМ I—IV

- 1: Тотальный препарат *G. orbis* (гемалаун, об. 40, ок. 7).
- 2: Тотальный препарат *G. murmanica* (гемалаун, об. 40, ок. 7).
- 3—7: Нуклеолярный цикл у *Geleia orbis*: 3 — макронуклеусы с большими РНК-сферами; 4—2 макронуклеуса с базофильными вакуолями; 5 — излияние содержимого РНК-вакуоли в цитоплазму; 6 — макронуклеусы со светлыми вакуолями (1 микронуклеус); 7 — обратное развитие вакуолей (1 микронуклеус); (микрофотографии срезов, объектив 90, окуляр 20); 3 — 4 метиловый зеленый пиронин; 5 — 7 — железный гематоксилин Гейденгайна).
- 8: Макро- и микронуклеусы *G. murmanica* (гематокс. Гейд., об. 90, ок. 20).
- 9—12: Вариации числа ядер у *Geleia orbis*. 9—2 макронуклеуса (Ma), 1 микронуклеус (Mi); 10 — 3 макро-, 2 микронуклеуса; 11 — 4 макро-, 2 микронуклеуса; 12 — 6 макро-, 3 микронуклеуса. (С тотальных препаратов; 9, 10 и 12 — гемалаун, 11 — метиловый зеленый-пиронин; н — нуклеолы.)
- 13—16: Цитохимические особенности ядер *G. orbis* — макронуклеусы только с мелкими нуклеолами. (13 — фельген-лихтгрюн; 14 — галлоцианин; 15 — галлоцианин после удаления РНК 1N HCl, 16 — сулемовый раствор бромфенолового синего. Срезы.)

17—22: Нуклеолярный цикл у *G. orbis*. 17—19 — рост РНК-сферул, метиловый зеленый — пиронин; 20 — образование РНК-вакуолей, сулемовый раствор бром-фенолового синего; 21 — светлые вакуоли после выхода РНК, галлоцианин; 22 — обратное развитие вакуолей, метиловый зеленый-пиронин. (Срезы.)

23—24: Ядерный аппарат *Geleia murmanica*. 23 — 6 макронуклеусов (Ma), содержащих только мелкие нуклеолы (н), и 3 микронуклеуса (Mi); 24 — 3 старых, 2 молодых макронуклеуса с РНК-сферами и 3 микронуклеуса. (Срезы 5  $\mu$ , метиловый зеленый — пиронин.)

25—27: Деление *Geleia orbis*. 25 — после 1-го деления микронуклеуса, 26 — ядерный аппарат будущей дочерней особи, телофаза 2-го деления микронуклеуса; 27 — развитие зачатков макронуклеусов (зм) в обеих дочерних ядерных группах. (Срезы 10  $\mu$ , 25 и 26 — метиловый зеленый-пиронин, 27 — толуидиновый сини.)

28—30: Деление и ядерная реорганизация у *Geleia murmanica*. 28 — деление цитоплазмы, распределение ядер; 29 — ранняя стадия развития зачатка макронуклеуса (зм); 30 — развивающийся зачаток макронуклеуса (зм) и дегенерирующий макронуклеус (дм). (Срезы 5  $\mu$ , 28 и 30 — метиловый зеленый-пиронин, 29 — Фельген-лихтергюн.)

#### EXPLANATION OF PLATES I—IV

1: Whole mount of *G. orbis* (40  $\times$  7, haemalum).

2: Whole mount of *G. murmanica* (40  $\times$  7, haemalum).

3—7: Nucleolar cycle in *Geleia orbis*. 3 — macronuclei with big RNA spherules; 4 — 2 macronuclei with basophilic vacuoles; 5 — streaming of RNA-vacuole content into cytoplasm; 6 — macronuclei with clear vacuoles (1 micronucleus); 7 — back development of vacuoles (1 micronucleus). (photographs of sections, 90 $\times$ 20; 3 and 4 — methyl green-pyronin, 5 to 7 — iron haematoxylin of Heidenhain).

8: Macro-and micronuclei of *G. murmanica* (90 $\times$ 20, iron haematox.).

9—12: Variations of number of nuclei in *Geleia orbis*. 9 — two macronuclei (Ma), one micronucleus (Mi); 10 — three macronuclei, two micronuclei; 11 — four macronuclei, two micronuclei; 12 — six macronuclei, three micronuclei. (Whole mounts; 9, 10 and 12 — haemalum, 11 — methyl green — pyronin; H — nucleoli).

13—16: Cytochemical peculiarities of nuclei in *G. orbis* — macronuclei with only small nucleoli. (13 — Feulgen-light green, 14 — gallocyanin, 15 — gallocyanin after extraction of RNA with 1N HCl, 16 — mercuric bromphenol blue; sections).

17—22: Nucleolar cycle in *G. orbis*. 17—19 — growth of RNA spherules, methyl green-pyronin; 20 — formation of RNA vacuoles, mercuric bromphenol blue; 21 — clear vacuoles after extrusion of RNA, gallocyanin; 22 — back development of vacuoles, methyl green-pyronin (sections).

23—24: Nuclear apparatus of *Geleia murmanica*. 23 — six macronuclei (Ma) containing only small nucleoli (H), and three micronuclei (Mi); 24 — three old macronuclei, two young macronuclei with RNA spherules, and three micronuclei. (Sections of 5  $\mu$ , methyl green—pyronin).

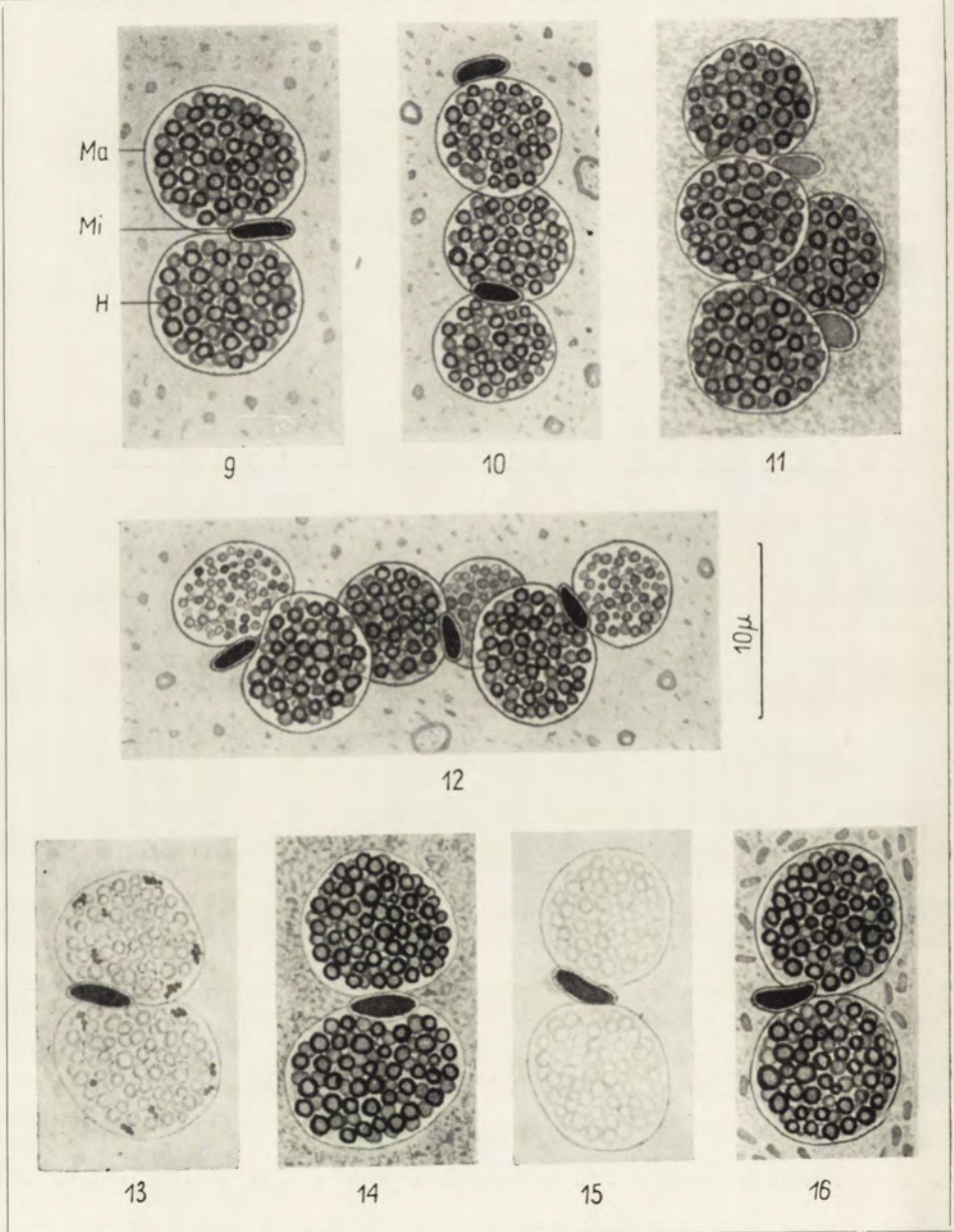
25—27: Division of *Geleia orbis*. 25 — after the first micronuclear division; 26 — nuclear apparatus of the future daughter individual in telophase of the second micronuclear division; 27 — development of the macronuclear primordia (зм) in both sister nuclear groups (sections of 10  $\mu$ , 25 and 26 — methyl green-pyronin, 27 — toluidine blue).

28—30: Division and nuclear reorganization in *Geleia murmanica*. 28 — division of cytoplasm, segregation of nuclei; 29 — early stage of development of the macronuclear primordium (зм); 30 — developing macronuclear primordium (зм) and degenerating macronucleus (дм). (Sections of 5  $\mu$ ; 28 — and 30 — methyl green—pyronin, 29 — Feulgen—light green).



I. B. Raikov

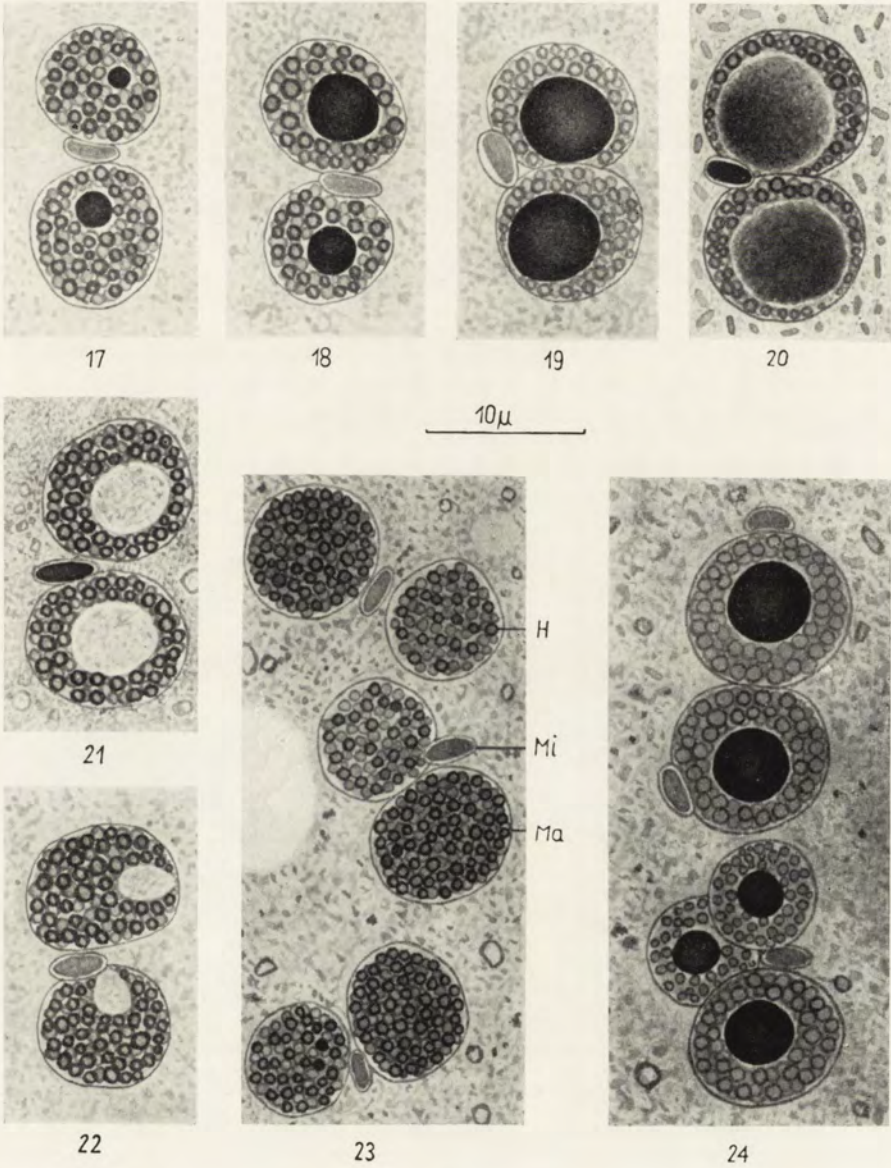
auctor phot.



I. B. Raikov

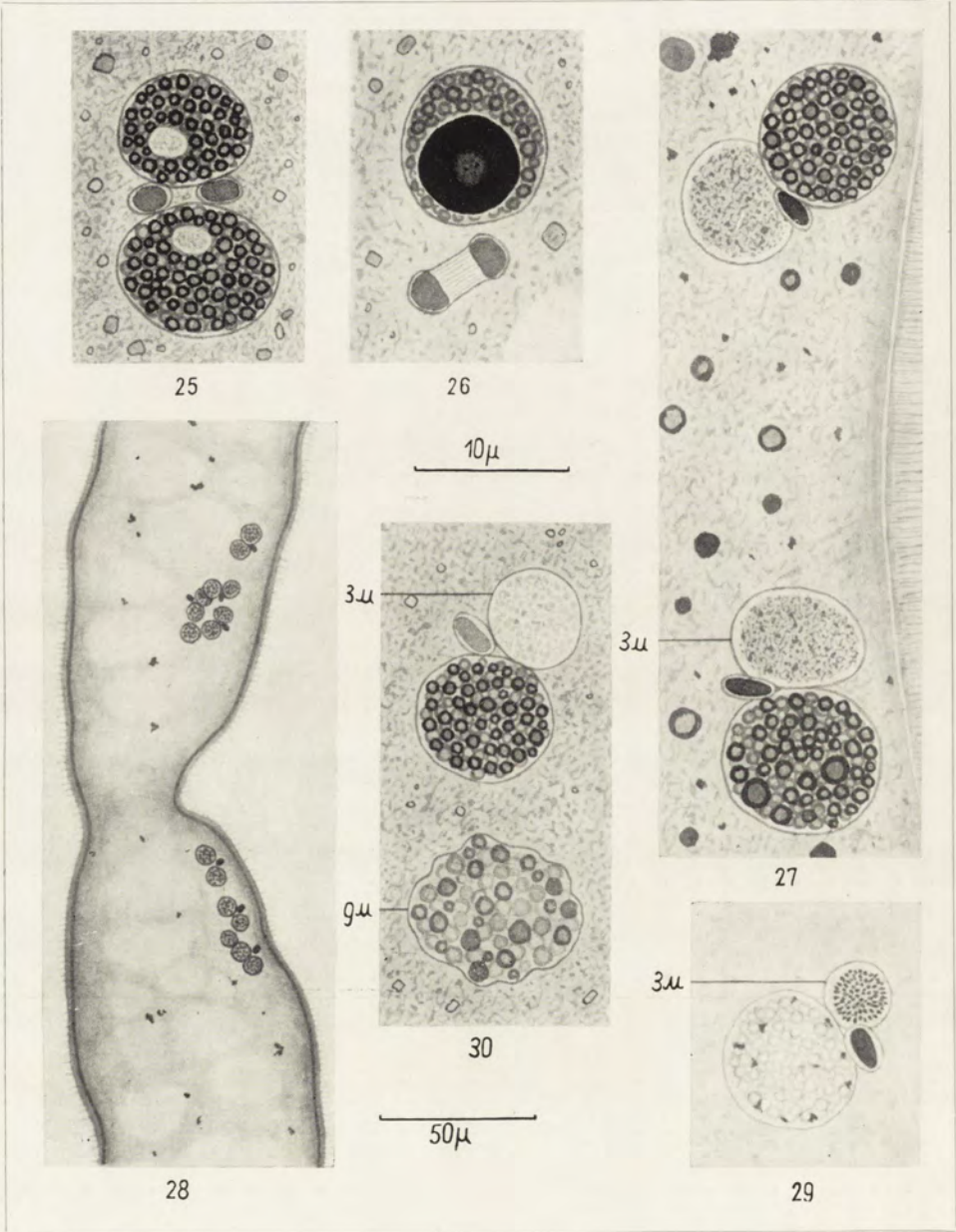
auctr del.





I. B. Raikov

auctor del.



I. B. Raikov

auctor del.

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Малкина 32  
Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR,  
Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32

М. Н. ГОЛИКОВА

M. N. GOLIKOVA

Морфологическое и цитохимическое исследование  
жизненного цикла  
*Nyctotherus cordiformis* Stein

Morphological and cytochemical study of the life cycle of  
*Nyctotherus cordiformis* Stein

Интерес цитохимических исследований многих видов паразитических простейших заключается прежде всего в том, что их жизненные циклы находятся в строгом соответствии с возрастными и сезонными изменениями в биологии их хозяев. Примеры приспособления цикла паразитов к биологическим особенностям хозяина среди простейших известны для жгутиконосцев из кишечника тараканов, термитов, для простейших, населяющих кишечник амфибий. Одним из таких видов и является избранный для настоящего исследования *Nyctotherus cordiformis* — инфузория, паразитирующая в задней кишке некоторых видов амфибий. *N. cordiformis* приспособляется к изменениям окружающей среды по мере роста и метаморфоза амфибий от головастика до взрослых особей. В связи с этим несомненный интерес представляет исследование цитохимических изменений цитоплазмы и ядра инфузорий на различных этапах цикла, при различных физиологических состояниях хозяина.

К настоящему времени описано свыше 30 видов рода *Nyctotherus*, паразитирующих в основном в кишечниках амфибий, рептилий, редко рыб, млекопитающих, моллюсков. Все исследования касаются главным образом систематики и морфологии простейших. Жизненный цикл *N. cordiformis* прослежен Боевой-Петрушевской 1933 и Вихтерманом (Wichterman 1936). Цитохимическое исследование жизненных циклов других простейших из кишечника амфибий проведено Сухановой 1953, 1959, 1960 и 1961 (*Opalina ranarum*, *Protoopalina intestinalis*, инфузории рода *Balantidium*). Краткие сведения о запасных питательных веществах *N. cordiformis* приведены в статьях Боевой-Петрушевской и Лома (Lom 1955). Локализация жира и гликогена исследована и у некоторых других инфузорий рода *Nyctotherus* (Dutta 1958).

## Материал и методика

Материал настоящего исследования получен в результате вскрытия 819 экземпляров амфибий (земноводные вскрывались сразу же после взятия их из природных, естественных условий обитания) из окрестностей Ленинграда: 806 экземпляров травяной лягушки — *Rana temporaria* (171 половозрелая лягушка, 37 сеголетков и 598 головастика), 10 обыкновенных жаб — *Bufo bufo* и 3 экземпляров остромордых лягушек — *Rana terrestris*. Зараженными *Nyctotherus cordiformis* оказались 572 амфибии (70%), в том числе 5 жаб и 567 травяных лягушек (67% взрослых лягушек, 89% сеголетков и 76% головастика разных возрастов).

Для того, чтобы получить представление о составе популяции и размерах инфузорий, изготавливались мазки содержимого прямой кишки амфибий на предметных стеклах и фиксировались жидкостью Шаудина. Затем мазки окрашивались железным гематоксилином Гейденгайна и реактивом Фельгена (175 мазков). Измерения инфузорий проводились ежемесячно в нескольких популяциях, по 30—50 экземпляров в каждой.

Для выявления динамики полисахаридов проводилась окраска живых инфузорий жидкостью Люголя. Кроме того, не менее 5 популяций каждый месяц фиксировалось с кишечником хозяина жидкостью Карнуа. После заливки в парафин изготавливались срезы, толщиной 5 м, которые окрашивались реактивом Фельгена после обработки  $KIO_4$  (PAS) и 4% хромовой кислотой (по Бауэру). Для выявления кислых мукополисахаридов проводилась окраска срезов альциановым синим.

Распределение жира у *N. cordiformis* определялось окраской Суданом III и Суданом черным после фиксации формалином. Во все сезоны года инфузории фиксировались жидкостью Ценкера с формалином, фиксатором Шампи для исследования цитоплазматических структур. Окраска митохондрий произведена по методу Кулля (Ромейс).

Характеристика жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis*

Жизненный цикл *N. cordiformis* тесно связан с биологией хозяина (рис. 1). Цисты *N. cordiformis* образуются в основном ранней весной, в период икрометания амфибий. Огромное количество цист в водоеме обеспечивает заражение развившихся из икры головастика, питающихся растениями и детритом. В кишечнике головастика инфузории экцистируются и приступают к делению. *N. cordiformis* найден нами у головастика травяной лягушки примерно через месяц после их выхода из икры. С возрастом зараженность головастика *N. cordiformis* повышается, достигая почти 100% у окончивших метаморфоз, выходящих на сушу лягушек.

В головастиках с развитой задней парой конечностей, в период, когда кишечник перестраивается в связи с переходом головастика от питания растительной пищей к питанию животной пищей, происходит половой процесс у *N. cordiformis* — инфузории конъюгируют. У других простейших, обитающих в задней кишке лягушек (опалин) половой процесс также происходит в кишечнике головастика, обитатели же тонкой и двенадцатиперстной кишки амфибий — инфузории рода *Balantidium* конъюгируют весной и летом в кишечнике половозрелых амфибий (Суханова 1953, 1959, 1960, 1961).

Процессы конъюгации и реорганизации ядерного аппарата происходят в общем обычным образом, однако развитие зачатка макронуклеуса, длящееся в течение нескольких недель, требует дальнейшего тщательного цитохимического исследования. После полной реорганизации ядерного аппарата *N. cordiformis*

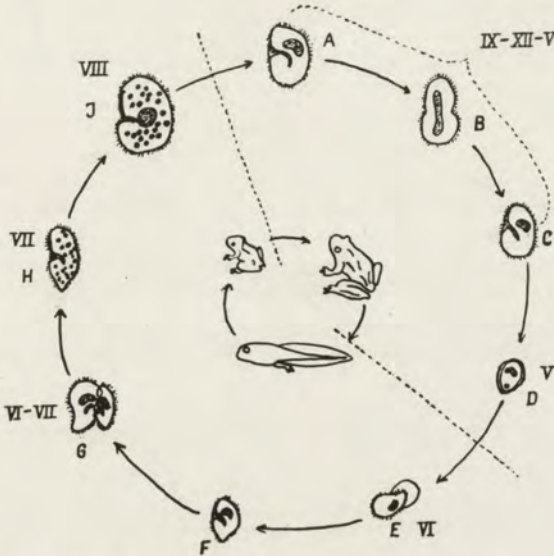


Рис. 1. Схема жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis* и лягушки

А — вегетативная особь, В — деление, С — особь после деления, D — циста, Е — выход из цисты, F — пре-конъюгант, G — конъюгация, H, I — эконъюганты разных стадии (по Боевой-Петрушевской 1933)

инфузории размножаются простым делением, образуя более или менее крупные популяции. Поздней осенью, зимой и ранней весной, во время спячки амфибий, инфузории почти не делятся. Весной, в период икрометания амфибий, *N. cordiformis* приступают к многократному делению, после чего образуются цисты, выводящиеся в воду.

### Морфология

*Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein, 1862 (*Ciliata*, *Heterotricha*) паразитирует в задней кишке целого ряда лягушек и жаб Европы, Азии и Америки. Морфологическая характеристика инфузорий этого вида приводится кратко при первоописании, более подробно в работе Вихтермана (Wichterman 1936) по экземплярам из американской лягушки *Hyla versicolor*. *N. cordiformis* из травяной лягушки и обыкновенной жабы характеризуются следующими морфологическими признаками: вегетативные особи *N. cordiformis* (рис. 2) имеют почковидную форму, причем ширина тела составляет 2/3 длины. Брюшная сторона вогнута, спинная — уплощена. Ресничные ряды идут на спинной стороне параллельно друг другу и оканчиваются на брюшной стороне. Ротовая щель расположена на

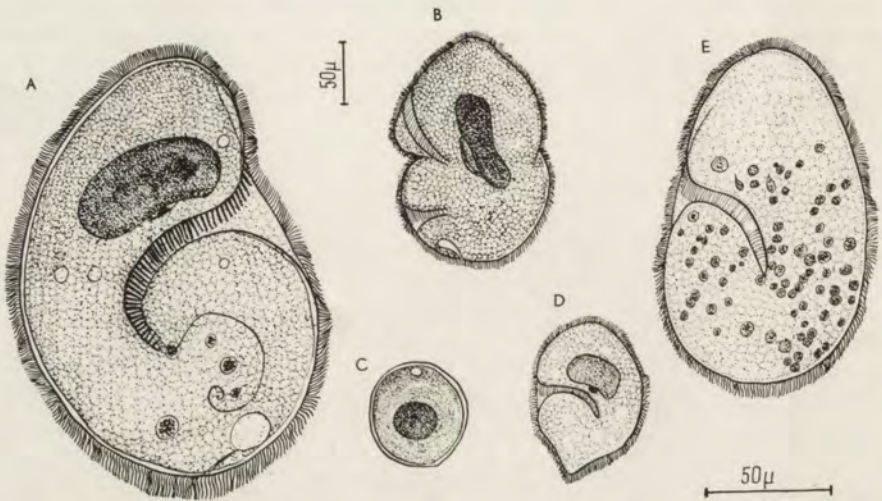


Рис. 2. Стадии развития *Nyctotherus cordiformis*.

А — вегетативная форма, В — деление, С — циста, D — прекоњугант, Е — экзокоњугант

брюшной стороне косо сверху вниз и прикрыта околоротовыми мембранеллами. Глотка заканчивается вблизи заднего конца тела. Цитофаринкс переходит в тонкую закрученную нить. На заднем конце тела помещается сократительная вакуоль, открывающаяся наружу каналом в области цитопига.



Рис. 3. Митохондрии *Nyctotherus cordiformis* — срез, толщиной 5μ (после фиксации по Шампи, окраска по Куллю).

Макронуклеус, овальный или почковидный, расположен в передней трети тела над перистомом. Микронуклеус — маленькое линзовидное образование, размером  $2.2 \times 4.4 \mu$ , расположен у внутренней стороны макронуклеуса. Эндоплазма инфузорий заполнена включениями и совершенно непрозрачна. Запасные питательные вещества представлены в первую очередь гликогеном, зерна которого заполняют всю эндоплазму, и каплями нейтрального жира. Митохондрии имеют палочковидную форму, расположены в несколько рядов плотным слоем под пелликулой (рис. 3). Особенно много митохондрий в переднем конце инфу-

зории, над макронуклеусом, что подтверждается и электронномикроскопическими данными (Stahlmann 1962), в середине же тела их немного.

Вегетативные особи *N. cordiformis* весной, летом и осенью делятся простым делением надвое (рис. 2), однако этот процесс происходит по-видимому быстро, так как в популяциях очень редко встречаются делящиеся инфузории. Цисты *N. cordiformis*, округлой или овальной формы, окружены тонкой оболочкой. Величина свежих цист  $60 \times 50$ — $55 \mu$ . Размеры макронуклеуса, овальной, почковидной или округлой формы —  $21.5 \times 11 \mu$ . Эндоплазма цист заполнена каплями нейтрального жира и зернами гликогена. Инфузории из кишечника головастика, развившиеся из заглоченных ими цист, значительно прозрачнее, так как в них меньше запасных питательных веществ. Перед конъюгацией у инфузурий не-

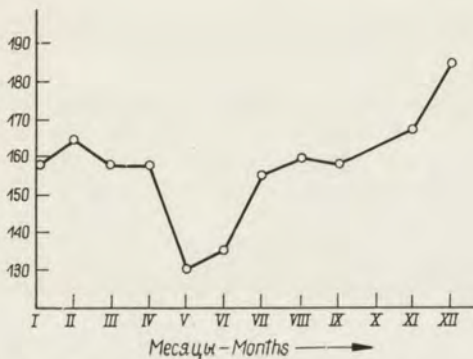


Рис. 4. Изменение размеров вегетативных особей *Nyctotherus cordiformis* (в микронах) в течение года

много изменяется форма тела — вытягивается и заостряется задний конец (рис. 2). Так же выглядят и конъюганты. Эксконъюганты приобретают нормальную форму тела, но макронуклеус их распадается на большое количество фрагментов.

Величина вегетативных особей изменяется в зависимости от сезона года, физиологического состояния хозяина (рис. 4). Wichterman 1936 приводит следующие размеры типичного экземпляра *N. cordiformis* из *Hyla versicolor*: длина  $136 \mu$ , ширина —  $97 \mu$ , Ма —  $16 \mu \times 44 \mu$ . По нашим данным средняя длина вегетативных особей *N. cordiformis* из *Rana temporaria* в различные месяцы года колеблется от  $130 \mu$  до  $189 \mu$ , ширина — от  $88$  до  $141 \mu$ , величина макронуклеуса от  $51.5 \mu \times 22.1 \mu$  до  $69.6 \mu \times 27.6 \mu$ . Наибольшей величины инфузории достигают в осеннезимний период (см. график, табл. 1), когда паразитические простейшие в кишечнике амфибий вследствие низкой температуры, спячки хозяина, почти не делятся. Наименьшие величины инфузурий наблюдаются в мае, во время икрометания амфибий, когда *N. cordiformis* многократно делятся и, наконец, образуют цисты. Таким же образом изменяются и размеры опалин (Суханова 1953). Характер кривых размеров инфузурий отдельных

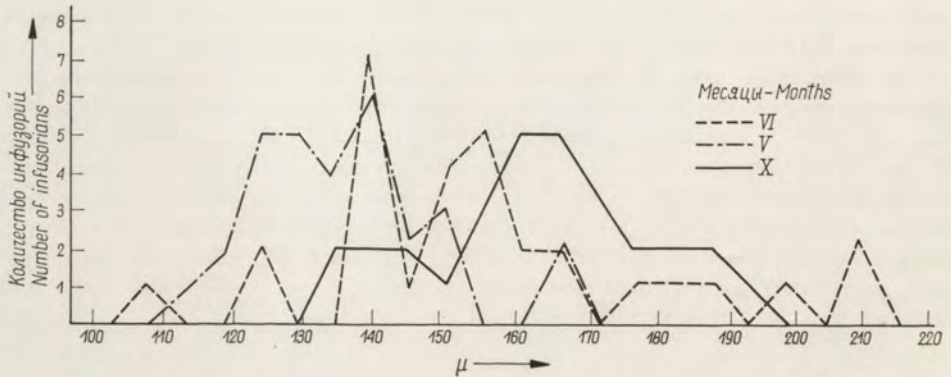


Рис. 5. Длина инфузорий в популяциях в мае, июне и октябре

популяций различен, но кривые летних инфузорий, интенсивно делящихся и быстро растущих, как правило более растянутые, чем зимой и весной (рис. 5). Коэффициенты вариации размеров *N. cordiformis* колеблются в среднем между 7—15%.

Таблица 1

Изменение размеров вегетативных особей *Nyctotherus cordiformis* в течение года

Месяц	Размеры в микронах			
	Длина	Ширина	Длина макро- нуклеуса	Ширина макро- нуклеуса
Январь	159.1 ± 3.2	109.2 ± 2.3	60.2 ± 1.4	25.8 ± 0.5
Февраль	164.2 ± 3.0	111.2 ± 2.2	63.4 ± 1.3	26.4 ± 0.6
Март	157.9 ± 2.3	115.8 ± 1.5	60.7 ± 1.1	26.6 ± 0.7
Апрель	157.8 ± 4.2	111.8 ± 3.6	60.2 ± 1.8	25.6 ± 0.6
Май	129.8 ± 2.4	88.3 ± 1.2	51.5 ± 0.8	22.1 ± 0.6
Июнь	135.6 ± 2.9	97.6 ± 2.2	55.9 ± 1.3	22.2 ± 0.7
Июль	154.5 ± 3.6	110.2 ± 2.7	62.0 ± 1.5	23.7 ± 0.7
Август	160.4 ± 2.6	105.8 ± 1.9	62.4 ± 1.0	26.6 ± 0.6
Сентябрь	158.5 ± 2.9	113.6 ± 2.3	62.3 ± 1.1	20.0 ± 0.6
Октябрь	163.2 ± 3.0	121.6 ± 2.6	65.2 ± 1.6	24.1 ± 0.7
Ноябрь	168.8 ± 2.6	122.7 ± 1.7	62.8 ± 1.2	24.6 ± 0.6
Декабрь	189.3 ± 4.2	141.4 ± 3.0	69.6 ± 1.5	27.6 ± 0.4

Особенно интенсивным ростом характеризуются инфузории из кишечника сеголетков, после недавно прошедшей конъюгации (табл. 2), где уже в сентябре средняя длина их достигает 185 μ (длина инфузорий из взрослых лягушек в этот период около 160 μ), причем об интенсивности делений и роста в попу-



Таблица 2

Величина вегетативных особей *Nyctotherus cordiformis* из сеголетков в микронах

Месяцы	Июль	Сентябрь
Длина	151.3 ± 3.9	185.0 ± 4.4
Ширина	108.6 ± 3.2	135.2 ± 3.6
Длина макронуклеуса	64.6 ± 1.8	70.0 ± 1.9
Ширина макронуклеуса	25.9 ± 1.2	27.6 ± 1.6

Таблица 3

Размеры инфузорий из головастиков в микронах

Инфузории	Длина	Ширина	Длина Ма	Ширина Ма
Прекоњуоганты	110.0 ± 3.0	78.3 ± 2.2	38.9 ± 1.2	18.3 ± 0.6
Конъюганты	1 95.0	54.0	31.3	20.5
	2 83.2	46.4	26.8	15.1
Экскоњуоганты	126.2 ± 2.9	89.8 ± 2.4	—	—

ляциях говорит высокий коэффициент вариации размеров макронуклеуса (свыше 30%). Наиболее мелкими являются инфузории из кишечника головастиков. Только что эксцистировавшиеся особи имеют еще округлую форму, диаметр их 27 м, диаметр округлого макронуклеуса — 5.7 м. Как правило конъюгирующие инфузории немного отличаются по величине (табл. 3).

Динамика запасных питательных веществ

Сезонные изменения в биологии хозяев и их паразитов сказываются и на запасных питательных веществах, которые у *N. cordiformis* представлены нейтральным жиром и гликогеном.

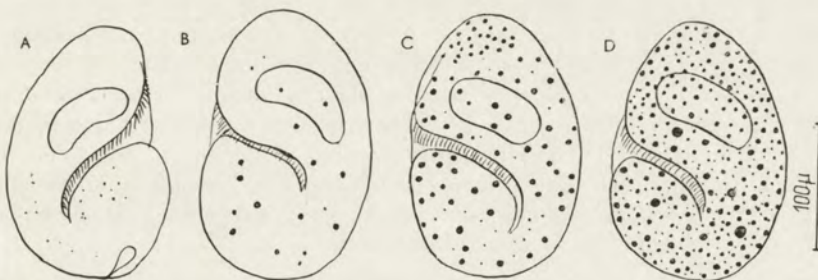


Рис. 6. Классы инфузорий по количеству нейтрального жира.

Нейтрального жира у *N. cordiformis* сравнительно немного, он распределен более или менее равномерно в виде капелек различной величины. Для удобства сравнения количества жира на различных стадиях цикла инфузории разбивались на классы (Барбарин 1937а, б, 1938; Манусова 1939; Суханова 1953 и др.) по содержанию жира (рис. 6). Оказалось, что поздней осенью, зимой и ранней весной большинство инфузорий относится (табл. 4) к II и III классам поровну (с ноября по апрель). Значительное увеличение количества жира у инфузорий падает на два периода: май — июнь и сентябрь — октябрь (свыше 70% *N. cordiformis* относится в это время к III классу). Это связано с особой интенсификацией питания хозяев весной после зимнего голодания и осенью, в период подготовки к спячке. Летом происходит сдвиг в сторону первого и второго классов.

Таблица 4

Количество жировых включений у инфузорий  
в течение года в %

Месяцы	Классы			
	0 и I	II	III	IV
I—II	14	32	44	10
III—IV	16	46	35	3
V—VI	7	21	70	2
VII—VIII	41	40	18	1
IX—X	11	15	73	1
XI—XII	21	40	38	1

У *N. cordiformis* по нашим данным нет такого резкого уменьшения количества жира к весне, как это имеет место у опалин, обитающих там же, где и эти инфузории (Суханова 1953). В то же время, не наблюдается и накопления „голодного” жира к весне, как у протоопалин (Суханова 1961) и инфузорий рода *Balantidium* (Суханова 1959), обитающих в иных условиях — в тонкой кишке лягушек, где не задерживаются пищевые частицы, в отличие от прямой кишки, в которой даже ранней весной сохраняются еще остатки пищи с осени, не говоря уж о богатой флоре микроорганизмов. Отсутствие резких колебаний в количестве нейтрального жира у *N. cordiformis* в разное время года по-видимому и является следствием более или менее постоянного наличия пищи в окружающей среде. Опалины, питающиеся осмотически, к весне начинают, по-видимому, все же испытывать голод, но это не доходит до расщепления липопротеинового комплекса эндоплазмы с образованием „голодного” жира, а лишь сказывается в уменьшении количества запасных питательных веществ, в том числе и жира.

В цистах *N. cordiformis* жир присутствует в значительных количествах (не ниже III класса). У инфузорий, развивающихся из цист в кишечнике голо-

вастиков, количество жира уменьшается, так как в этот период происходит интенсивное деление инфузорий. В то же время, в кишечнике головастиков, питающихся растительной пищей не происходит значительного восстановления запасных питательных веществ. У конъюгантов и эксконъюгантов жира почти нет, в отличие от свободноживущих организмов (Полянский 1934; Барбарин 1937а). По-видимому так же в задней кишке лягушек условия не полностью анаэробны, так как при отсутствии кислорода жира должно быть больше (Жинкин 1929; Барбарин 1938). Судан черный окрашивает не только капли нейтрального жира, но и липиды. При обработке этим красителем в синий цвет окрашивается пелликула, реснички, митохондрии, оболочка ядра.

Гликогена у *N. cordiformis* очень много, зерна его равномерно распределены по всему телу инфузорий, но как правило его больше в передней трети, там, где сосредоточена основная масса митохондрий. По-видимому, зерна гликогена развиваются при действии ферментов, производимых митохондриями (Dutta 1958). Гликоген *N. cordiformis* не растворяется в холодной воде и гидролизуется птиалином слюны через 40 минут (Lom 1955). Поздней осенью, зимой и ранней весной основная масса инфузорий по содержанию гликогена относится к III и IV классам (рис. 7). Зерна гликогена заполняют всю эндо-

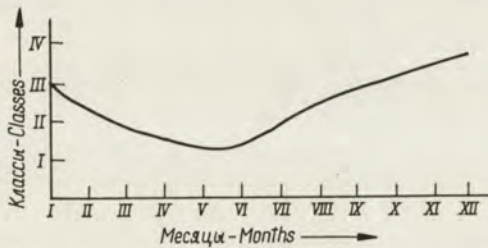


Рис. 7. Изменение количества гликогена у *Nyctotherus cordiformis* в течение года

плазму, причем в брюшной части инфузории они лежат менее плотно. Наибольший диаметр зерен, имеющих округлую или продолговатую форму, достигает в это время 2—2,5  $\mu$ , причем они все примерно одинаковой величины. Интересно отметить, что *N. cordiformis*, найденные не в прямой кишке, как обычно, а в конце тонкой — значительно беднее гликогеном. Зерна гликогена иногда кажутся не шаровидными, а плоскими, в виде чешуек, и в этом случае они обычно крупнее, достигают 5  $\mu$  в диаметре.

В апреле количество гликогена немного снижается, однако полного голодания *N. cordiformis* из-за богатой микрофлоры прямой кишки хозяина не происходит. В момент перехода лягушек в воду, когда начинается бурное деление инфузорий, интенсификация их физиологической деятельности, резко снижается количество гликогена. Зерна его как бы обтаивают, уменьшаются в диаметре сперва до 2  $\mu$ , а потом становятся менее 1  $\mu$ . Итенсивность окраски их при реакции PAS значительно снижается, а окраска жидкостью Люголя как правило выявляет лишь небольшое количество гликогена на переднем кон-

це тела над макронуклеусом (рис. 8). В делящихся особях и цистах есть гликоген, но не очень много. В июне на живом материале жидкостью Люголя совсем не удается обнаружить гликогена. Однако реакция PAS выявляет мельчайшие светлоокрашенные гранулы, исчезающие после обработки препарата слюной. Здесь, по-видимому, можно говорить о следах гликогена. В конце июня на фоне мельчайших зерен появляется небольшое количество более крупных

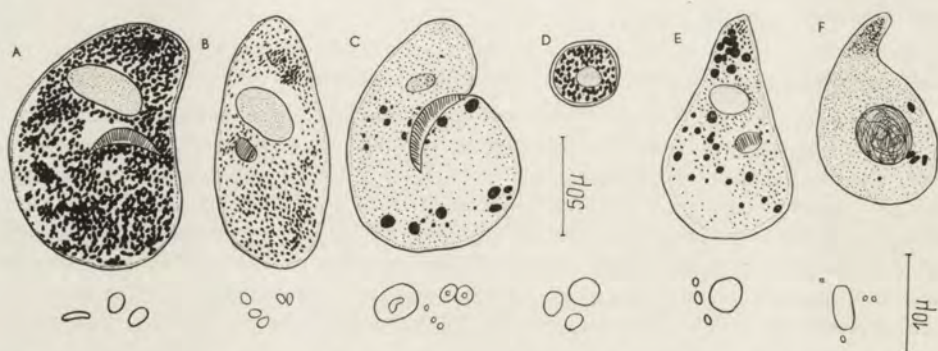


Рис. 8. Количество гликогена на различных стадиях цикла *N. cordiformis*. Реакция PAS — срезы, толщиной 5  $\mu$ .

A—C — вегетативные особи (A — в осеннезимний период, B — в мае, C — в июне), D — циста, E — преконъюгант, F — эконъюгант. (Инфузории даны при увеличении об. 40, ок. 10, гранулы гликогена — об. 90, ок. 20)

и яркоокрашенных гранул, достигающих 6  $\mu$  и более в диаметре. В июле, в середине лета происходит заметное укрупнение гранул, так что большинство их достигает 3  $\mu$  в диаметре, но количество их еще меньше, чем в осенне-зимний период. В августе гранул уже больше, они заполняют всю эндоплазму. Осенью гликогена очень много.

В весенних цистах гликоген всегда есть и он расходуется быстро при экцистировании и делении инфузорий в кишечнике головастика. Диаметр гранул в цистах — 2—3  $\mu$ . Прекоконъюганты сильно вакуолизированы, гликогена в них немного. Однако наряду с бледноокрашенными мелкими гранулами (около 1  $\mu$ ) встречается немного крупных гранул (4  $\mu$  и более). У конъюгантов крупных гранул нет. В эндоплазме эконъюгантов появляется небольшое количество крупных зерен, на фоне мельчайших, менее 0,5  $\mu$ . Осенью, в подросших сеголетках, инфузории забиты гранулами гликогена (IV класс). Гранулы крупные, более или менее равные по величине (более 4  $\mu$  в диаметре). Кислые мукополисахариды у инфузорий не обнаружены.

#### Выводы

1. Размеры вегетативных особей изменяются в течение года в зависимости от сезона и физиологического состояния хозяина.

2. Динамика запасных питательных веществ *N. cordiformis* находится в тесной зависимости от жизненного цикла хозяина, способа питания паразита и от места обитания в хозяине.

3. Жир и гликоген накапливаются преимущественно в моменты весеннего и осеннего нагула лягушек, их усиленного питания, и количество запасных питательных веществ снижается во время интенсификации физиологической деятельности инфузорий, в период активного бесполого размножения в кишечнике взрослых лягушек и жаб весной, когда они переходят в воду для икрометания, и полового процесса — в кишечнике головастиков.

4. Зимнее и весеннее голодание хозяев не влияет в большой степени на количество запасных питательных веществ у *N. cordiformis*, в отличие от паразитических простейших (некоторые виды рода *Balantidium*), обитающих в тонкой кишке, так как в задней кишке всегда сохраняется для них источник питания — остатки пищи, заглоченной хозяином осенью и не полностью утилизированной в связи с низким обменом веществ во время зимней спячки и богатая микрофлора. Поэтому весной не происходит накопления „голодного“ жира и резкого снижения запасов гликогена. Опалины, питающиеся осмотически, не зависят в своем питании от микрофлоры, и испытывают в весне голод.

#### SUMMARY

The material was obtained from intestines of *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. The life cycle of *N. cordiformis* is strictly adapted to the biology of the host. The dimensions of trophical individuals vary from 130  $\mu$  to 189  $\mu$  in length in dependence on the season and physiological conditions of the host and the parasites. Dynamics of reserve material of *N. cordiformis* depend on the host life cycle, on mode of nutrition of the parasite and his localisation in the host.

Fat and glycogen are accumulating in spring and autumn, during the increased nutrition of frogs. The amount of reserve material decreases in the course of active asexual multiplication in the intestines of adult frogs and toads in spring, when the hosts migrate into water, and in time of sexual process within the intestine of tadpoles. The starvation of hosts in winter and spring have not a great influence upon the amount of the reserve material of *N. cordiformis*, because there is always some food in posterior gut available for the parasites.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ванерjee S. K. 1958: Preliminary observations of some cytochemical tests on *Nyctotherus ovalis* Leidy (*Ciliophora*). Arch. Protistenk. 102, 309—320.
- Барбарин В. В. 1937a: Факторы, определяющие баланс жира и гликогена у *Paramaecium caudatum*. Сообщение I. Влияние голода. Биол. журн. 6, 699—707.
- Барбарин В. В. 1937b: Факторы, определяющие баланс жира и гликогена у *Paramaecium caudatum*. Сообщение II. Влияние различной пищи. Биол. журн. 6, 708—720.
- Барбарин В. В. 1938: Факторы, определяющие баланс жира и гликогена у *Paramaecium caudatum*. Сообщение III. Влияние удушья на накопление жира и гликогена. Биол. журн. 7, 391—398.
- Боева-Петрушевская Т. П. 1933: Материалы к циклу развития *Nyctotherus cordiformis*. Тр. Петерофского биол. инст. 10, 341—344.
- Dutta G. P. 1958: The cytoplasmic inclusions of *Nyctotherus macropharyngeus*. Histochemical studies. Q. J. Micr. Sci. 99, 517—522.

- Lom J. 1955: Polysacharidové rezervy nálevniců rodů *Balantidium* a *Nyctotherus*. Ces. Biol. 4, 397—409.
- Манусова М. В. 1939: Сезонные изменения жира и гликогена в природных условиях у *Condylostoma vorticella*, *Frontonia leucas* и *Loxodes striatus*. Зоол. журн. 18, 451—460.
- (Полянский Ю. И.) Poljansky G. I. 1934: Geschlechtsprozesse bei *Bursaria truncatella* O. F. Müller. Arch. Protistenk. 81, 420—546.
- Stahlmann C. 1962: Die „Kernaufhängung“ des Makro- und Mikronukleus bei *Nyctotherus*-Arten (*Spirotricha*, *Ciliata*) und die mit diesem Thema in Zusammenhang stehenden Feinstrukturen. (Eine elektronmikroskopische Untersuchung). Zool. Beiträge, Neue Folge, 7, 27—82.
- Суханова К. М. 1953: Влияние факторов внешней среды на жизненный цикл *Opalina ranarum*. Уч. зап. Ленингр. пед. ин-та им. Герцена 91, 31—69.
- Суханова К. М. 1959: Цитофизиологическая характеристика *Protoopalina caudata* Zeller. Цитология 1, 333—340.
- Суханова К. М. 1960: Цитофизиологическая характеристика жизненных циклов инфузорий рода *Balantidium* из амфибий. Сб. Вопросы цитологии и протистологии. Ленинград, Изд. АН СССР, 285—312.
- Суханова К. М. 1961: Морфологическое и цитохимическое исследование *Protoopalina intestinalis*. Цитология 3, 577—585.
- Wichterman R. 1936: Division and conjugation in *Nyctotherus cordiformis*, with special reference to the nuclear phenomena. J. Morphol. 60, 563—611.
- Жинкин Л. Н. 1929: Жир и причины его образования у инфузорий *Stentor polymorphus* Ehrbg. Тр. Петергофского естеств.-научн. ин-та 6, 199—215.

Department of General Biology of the M. Nencki Institute of Experimental Biology,  
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Maria JERKA-DZIADOSZ

## Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg.

Morfogeneza w podziale i w regeneracji *Urostyla grandis* Ehrbg.

Similitude of the morphogenetic processes occurring in dividing cell to those in the physiological and post-traumatic regeneration has been arousing interest for years. *Hypotricha* became a nearly classical object of comparative study in the line of those two processes.

Up to present time the study of the ciliates of this group was mostly concerned with the species of a highly reduced and specialized cirri system, which undergoes very specific alterations.

It seems essential to examine the morphogenetic processes in the course of division and regeneration in some primitive representatives of *Hypotricha*. A convenient material may present *Urostyla grandis* Ehrbg. owing to its size, well investigated nuclear apparatus, its fairly regular ciliature and a considerable ability of regeneration.

I wish to express at once my thanks to prof. dr. Z. Raabe for his valuable suggestions concerning my study on regeneration, and to dr. M. Doroszewski for his help in my microtechnical experimenting as also for his protection in the course of my work.

### Material and methods

The culture of *Urostyla grandis* Ehrbg. was started in 1960, first as an uncontrolled culture originating from the river Jeziorka in the locality Jeziorna near Warszawa. As medium, dechlorized tap water was applied with addition of *Colpidium* as food. In 1961 a pure culture was started in the sterilized Pringseim's medium with *Tetrahymena pyriformis* Ehrbg. added as food. *Tetrahymena* was grown in the axenic proteoso-peptone Difco medium. Before being introduced into the *Urostyla* culture, the *Tetrahymena* containing nutrient was centrifuged and rinsed in the Pringsheim fluid.

For revealing the silverline system, the Klein's technique modified by Turner 1933 was applied. The distribution of cirri was examined after a rapid fixation in osmium tetroxide with sublimate, and after the iron haematoxylin staining following the method of P á r d u c z 1952.

The course of morphogenetic processes was also studied in the living material either in a suspended or in liquid paraffin embedded water drop. As immobilizing medium 0.08 mM solution of  $\text{NiCl}_2$  (Kuźnicki 1962) was used. This medium is inhibiting the movement of protozoa without arresting the action of cirri.

The physiological regeneration of *Urostyla* was obtained when instead of *Tetrahymena* rinsed in the Pringsheim medium and fed with proteoso-peptone, *Tetrahymena* without previous rinsing and fed with powdered milk with addition of yeast extract were supplied as food to the *Urostyla* culture.

For the study of the post-traumatic regeneration, several series of operations were executed: *Urostyla* was either cut transversally, or fragments of the body were cut off. For operations the individuals of *Urostyla* either in interphase or in division or in physiological regeneration were used. Operations were executed by means of sharpened dentistic needles.

Photomicrographs were taken with "Microphot" of Rathenow.

### M o r p h o l o g y

*Urostyla grandis* Ehrbg. measures 300—400  $\mu$ . The body is elongate, elliptical, more flexible in its anterior part, rather broad in the middle, narrowing towards the blunt posterior end.

In a normal inter-division individual the macronucleus consists of over hundred fragments. The number of micronuclei increases with age and may reach up to 50 (R a b e 1946, 1947). The single contractile vacuole is situated on the right of the peristomal groove and joints the two longitudinal canals running to the anterior and posterior regions of the body.

The peristome extends as far as 1/3 of the body. Its right border forms the adoral zone of the membranella (AZM) twisted around the anterior end; the left border is the conspicuous membranella undulans (UM). The area of the clow-shaped frontal cirri extend on the left side border of the peristome. They run from the anterior edge of the ciliate body reaching as far as the area of the buccal groove. There are 24 cirri situated in oblique rows: 5 cirri in the first row, 4 — in the second 3 — in the third, 2 — in the fourth, 1 — in the fifth and 9 cirri close to the peristome margin. The number of the transversal cirri is 12—16; they are disposed in the posterior part of the body in one oblique row. They sometimes are bifurcated at their ends which produces an impression as if their number was higher than it is indeed. The ventral and lateral aspects of the body are covered by 12 rows of small cirri; 7 rows run on the left, 5 — on the right side of the ventral surface of the body.

On the dorsal surface, three longitudinal rows of tiny bristles extend. They are not visible in the living ciliate but are revealed by iron haematoxylin staining. Similar bristles had been described by Gelei 1929 in *Euplotes patella*. The basal parts of those bristles are surrounded by a ring of grains which are black after the osmium (silver-nitrate) formalin fixation. According to Gelei they are sensory bristles receiving stimuli from the environment. Nevertheless they are not included into the neuromotoric system and fail to show connection with other cytoplasmic structures, at least in the light of present reports on this subject.



A very distinct superficial structure in *Urostyla* are the protrichocysts. Kahl 1932 in his description of this species mentioned „Protrichocysten in Reihen”. The distribution of protrichocysts is connected with the position of cirri in the ventral body surface (Pl. I). Protrichocysts are seen vitally as greenish granules. Their movement reminds the Brownian movement. They are impregnable with silver nitrate and stained with haematoxylin. The base of each of the frontal cirri is surrounded by several protrichocysts arranged in a horseshoe pattern.

The distribution of protrichocysts between the ventral cirri is represented in Pl. IV 8. A range of protrichocysts is also present at the base of the anal cirri.

### Division

Division in *Urostyla grandis* was studied by Tittler 1935, by Raabe 1946, 1947 — both authors were concerned with the nuclear apparatus — and by Fauré-Fremiet 1910 who studied the merotomy in division.

Fauré-Fremiet distinguished 3 stages in the division of *Urostyla*: in the stage I the ciliate becomes spherical, the macronucleus is condensed, micronuclei divide, the number of mitochondria duplicates. In the stage II the body shrinks and broadens, a new peristome and the caudal prolongation are formed and the division furrow appears. In the stage III the division furrow deepens so as to form the constriction. In his experiments Fauré-Fremiet tried to accelerate or to delay the division and to define the moment of dedifferentiation. Operations were performed on the ciliates in the stage II and III. They proved that in the individuals treated in the stage II the division recedes and the dividing *Urostyla* becomes a single individual again. When a fragment of the proter or of the opisthe in the stage III is severed, the division is not affected.

Biochemical investigations on respiration of *Urostyla* were carried out by Pigoń 1956, 1960.

### Behaviour of cirri in division

The division is initiated by formation of an area of small cilia in the middle of the ventral side of the ciliate body, near the peristome. This area extends backwards — between the rows of ventral cirri as well as forwards along the border of the peristome, closely to the vanishing undulating membrane. Differentiation of this area begins in the anterior part. Simultaneously the AZM for the opisthe arises and only after its complete detachment from the AZM of proter — the differentiation of the posterior organization area begins<sup>1</sup>.

Differentiation of the organization area in the proter occurs as follows:

<sup>1</sup> Stomatogenesis has not been the subject of this study. It seems however that the AZM of the opisthe arises in connection with the AZM of the proter being detached from its posterior part. The term „organization area” is used in this study to denominate structures called by Yow 1958 „cirral field”, by Hashimoto 1961 — „cirral primordium field”, „divisional cirral primordium” or „regeneration cirral primordium” and by Dembowska 1925 and 1926 as „champ regenerateur”

from the anterior uniform streak of cilia, parallel slightly oblique streaks of cilia differentiate. They shift left backwards towards the border of the body. After having reached the rows of ventral cirri, the streaks replace them extending forwards and backwards respectively.

When the adoral zone of the opisthe has differentiated, the anterior organization area shifts around the peristome to the right side of the body. Here streaks of cilia appear which replace the ventral cirri of the right side of the body. Frontal and transversal cirri differentiate the last in the part of the area closely adjacent to the peristome. The transversal cirri shift backwards and take their final position.

Differentiation of the organization area in the opisthe starts after the AZM has been formed. Like in the proter, parallel streaks of cilia differentiate and shift backwards to the left margin of the body. The streaks reaching the old cirri on the right side of the body replace them. Similarly on the margin

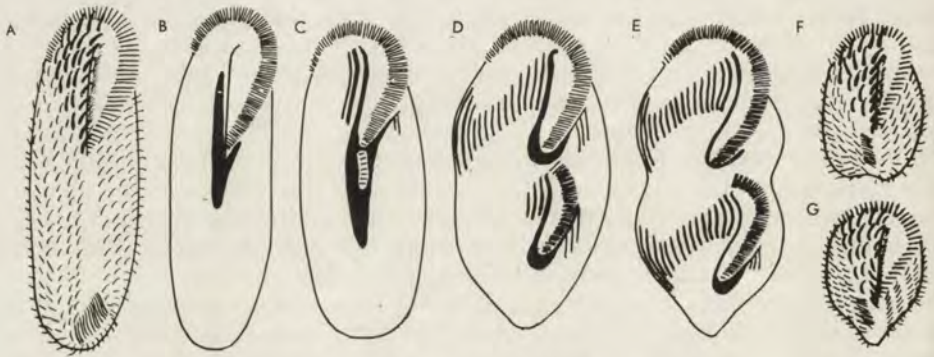


Fig. 1. Diagram of the division course

of the peristome, streaks of cilia differentiate from the organization area and replace the ventral cirri of the right side of the body. The frontal and transversal cirri arise also in the same way as they do in the proter.

Differentiation of the organization areas and, consequently formation of new cirri, occurs by a similar process in the proter as in opisthe. The difference concerns only the rate of this process which in the opisthe is somewhat delayed. This difference is compensated in the final phase of division when the fission furrow deepens.

When separated both progeny individuals are completely formed, however the transversal cirri are still in the level of the peristomal groove. Migration of the transversal cirri occurs only in connection with assuming the definitive shape of the ciliate body.

In the course of differentiation of the frontal and transversal cirri the fusion of cilia and formation of cirri may be observed. Streaks of cilia, initially uniform, begin to differentiate into groups. In each group, cilia approach one another so as to fuse in their basal parts; subsequently the fusion proceeds to the distal parts of cilia. Fusion of several cilia results in formation of a cirrus. After the Párducz's procedure different stages of cilia formation may be observed. The basal part of the young cirri is homogenous but the

ends are divided into separate cilia. This kind of uncompletely developed cirri are observed in young individuals after fission. In aged ciliates, cirri are uniform, those with branched ends occur rarely. The final formation of the frontal and anal cirri occurs in the terminal period of differentiation of the organization area, when those cirri have reached their definitive position (Plate IV).

#### Behaviour of cirri in physiological regeneration

The physiological regeneration in *Hypotricha* consists in dedifferentiation and formation „de novo” of the ciliature either of the whole body or of the peristomal structure only. The nuclear apparatus is also reorganized in this process.

The phenomena of physiological regeneration have been described by Dembowska 1938 in *Stylonychia mytilus*. This ciliate after starvation, instead of dividing, reorganizes its ciliary apparatus without division into two daughter individuals. Similar processes have been reported in some other ciliates. Neither the causes evoking this process nor its significance for the ciliate are sufficiently elucidated as yet.

In the *Urostyla* cultures a mass regeneration was observed when *Tetrahymena* introduced as food into the culture of *Urostyla* was fed with powdered milk with addition of yeast extract and was not rinsed before being added to the culture. Then the ciliate starts reorganization 1—3 h after feeding. In this period individuals in fission are observed very rarely. These conditions persist till the culture is rinsed and the normal diet is applied again.

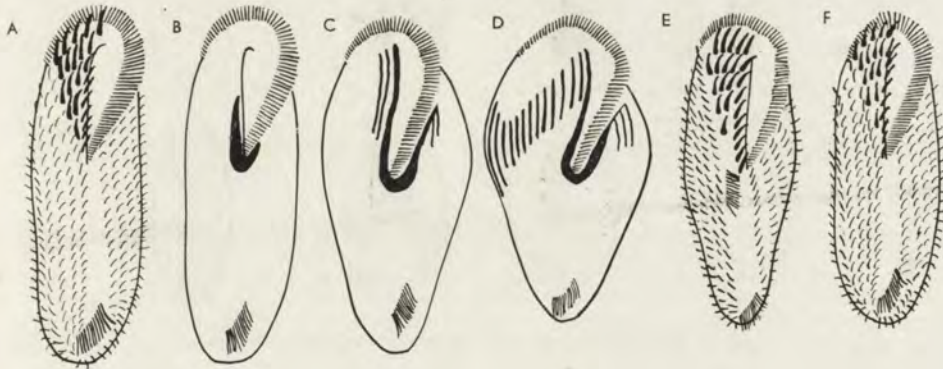


Fig. 2 The course of physiological regeneration

It must be stressed that the physiological reorganization was observed also in the normal cultures as well as in the material brought directly from the river.

In the initial moment of reorganization, on the ventral side of the body in the peristome region an area of small cilia appears. The cilia resemble to those formed in division. The area of those cilia fails to extend backwards further than half of the body length (Fig. 2). Subsequently the

area of small cilia extends forwards and — like in the proter during division — parallel oblique streaks differentiate in it. They migrate backwards and sideways up to the distance somewhat behind the peristomal groove. Here the streaks grow extending in the anterior and posterior direction penetrating on the place of old ventral cirri. Formation of the frontal and transversal cirri on the right side of the ciliate body occurs by the same process as in the proter. After the physiological regeneration, the normal shape of the ciliate is assumed characteristic for the inter-division individual except for the size which is somewhat smaller.

The similitude of division and physiological regeneration is so conspicuous that in the first stage it is almost impossible to decide with which of the two processes we have to do.

#### Formation of new cirri in the post-traumatic regeneration

##### Operations on adult individuals

In the first type of operation adult individuals were cut transversally in the middle line of the body. The anterior fragment contained the old AZM and UM, all the frontal cirri and a half of the ventral. For a long time after posterior fragment contains the transversal cirri and the remaining of the

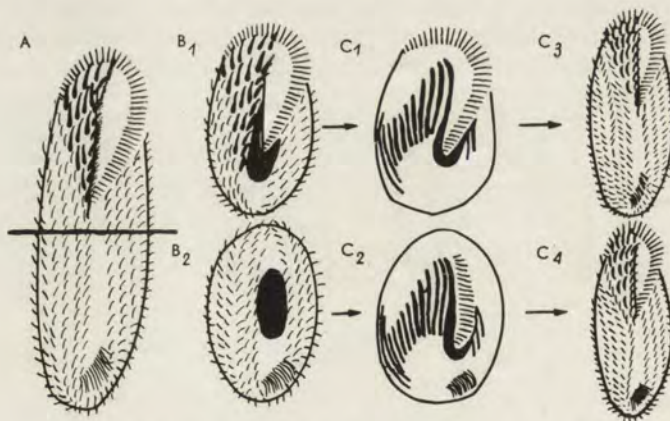


Fig. 3. The course of post-traumatic regeneration

ventral. This part stops moving a few minutes after operation. The wound heals slowly and the fragment assumes an oval shape. The rows of ventral cirri bend and agglomerate in the anterior region.

The regeneration of the posterior fragment begins 2.5—3 h after operation (Fig. 3 B<sub>2</sub>). In the middle line of the fragment, between the rows of ventral cirri, an area of small cilia arises. From this, the AZM and the parallel streaks of cilia differentiate. They run obliquely backwards to the margin of the body, similarly as it occurs in division or in physiological regeneration. From this part of the area, cirri of the right side arise; from

the streaks adjacent to the AZM frontal and transversal cirri are formed. From the remaining part of the area spreading to the right margin of the developing peristome, cirri of the right ventral side of the regenerating ciliate arise. The old transversal cirri and partly the ventral ones are shifted backwards and resorbed.

In the anterior fragment regeneration begins later, approx. 4 — 4.5 h after operation. Then the wound is already cicatrized. Like in the posterior fragment, the lateral cirri bend and agglomerate in the peristome region; an area of small cilia arises. Differentiation of the organization area occurs in the same way as in the posterior fragment. Old cirri are here also resorbed (Fig. 3 B<sub>1</sub>).

The second type of operation performed on adult individuals of *Urostyla* were sections removing a fairly small fragment of the body. These experiments had to prove which size of the injury is necessary to evoke the regeneration of the remaining part.

Variants of operation (Fig. 4 A):

1. The posterior part of the ciliate body was removed so that in the remaining fragment only a part or all the transversal cirri (VIII, VII, VI) were lacking. The ciliate regenerates 25 — 26 h after operation or no changes occur for 48 h. As a rule, only those individuals regenerate in which the line of section runs rather far from the end, nearer the middle line of the body (VI).

2. The anterior part was removed, together with several frontal and lateral cirri (I). AZM was not injured. None of the ciliates regenerated but the majority of them divided within 20 — 48 h after operation.

3. The anterior part was removed, AZM was injured (II). Like in the preceding experiment the ciliates failed to regenerate if only the two first rows of frontal cirri were removed. They divide within 20 — 48 h after operation. If the section was made more posteriorly than in the previous experiment (III, IV) the ciliates regenerate always.

The lateral part of the body was removed without injuring the AZM (V). Within 2 — 3 h the whole wound is healed. No regeneration occurs. Division follows 20 — 24 h after operation.

The above results of experiments indicate that the ciliates are able to regenerate when cutting is executed near the middle line of the body as well in the anterior region as in the posterior. Fragments with no peristome regenerate in all cases.

Operations in the course of division (Fig. 4 B)

1. Amputation of the anterior part of the individual in the early phase of division (I). With no regard to the level of the section the division always comes to completion. The constriction appears, the posterior uninjured individual detaches from the anterior. If the section concerned also the organization area, the anterior fragment regenerates after separation and reorganizes its ciliary system which has just been formed. The cut off fragments behave like the enucleated ones.

2. Amputation of the posterior part of the individual in the early phase of division (IV). Like in the operation 1, the division comes to completion

normally. The posterior individual regenerates after division if the organization area was injured. The amputated fragments behave like the enucleated parts.

3. The oblique section through the middle region of the body of the ciliate being in an early phase of division (II, III). Division comes normally to completion. The anterior individual separates the fragment belonging to the posterior, and the posterior — that belonging to the anterior.

4. The longitudinal section through the central region of the ciliate in early phase of division (V). Both fragments divide normally. Soon after division regeneration begins i.e. in each fragment an organization area arises, developing new cirri.

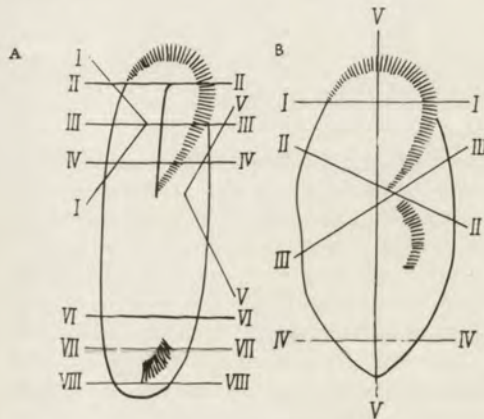


Fig. 4. Types of operations

5. Operation in an advanced phase of division when the posterior organization area is already differentiated and exerts no influence upon the course of division. If the organization area is injured, the post-division individuals regenerate which yet depends on the nature of injury.

Operations in the course of physiological regeneration.

1. Amputation of the posterior part of the body behind the organization area. The normal physiological regeneration is completed but no subsequent regeneration occurs.

2. Amputation of the anterior part of the ciliate. The organization area is injured. The wound is healed, the cilia from the organization area shift normally to their place. Only then the regeneration of the fragment begins.

#### Discussion

The above description of morphogenetic processes in *Urostyla grandis* indicate that the ciliature of the whole ventral side of the body arises in a definite place, in the region of the peristomal groove as well in the dividing individuals as in the regenerating under the influence of physiological stimuli and of operation injury.

In the *Hypotricha* studied previously, different categories of cirri arise in various places of the body, some of them in the organization area in the central region of the body, some near the paternal cirri.

These problems have already been studied by Wallengren 1902. In *Stylonychia* and *Uronychia* other centers of formation of marginal cirri besides the ventral organization areas have been stated. Similar structures were studied by Chatton and Seguela 1940 in *Euplotes patella* (Mueller), *E. crassus* Duj. and *Opistotricha monspessulana* Chatt. Seg. The presence of one organization center for the whole complex of ventral cirri in *Urostyla grandis* may be considered as an additional argument in favour of the theory of its comparatively primitive organization among the *Hypotricha*. The specialization of the ciliary apparatus in *Hypotricha* would in this way tend towards reduction of the number of cirri and towards their functional differentiation. As a result of differentiation of cirri into categories, the differentiation of the organization area of primordia is involved.

In the course of differentiation of cirri primordial areas, the process of cirri formation by adhesion of cilia may be observed in *Urostyla grandis*. Some authors considered that cirrus arises by fusion of cilia. The findings of Roth 1956, 1957, confirmed this theory. Roth revealed by his electron microscope study that in *Euplotes patella* the cirrus consists of several (5—8) rows of cilia, their bases forming a hexagonal plate. Each cilium of a cirrus keeps its structure unchanged. There is no envelope to surround all the cilia of a cirrus. Dembowska 1925 in her study on formation of cirri in regeneration of *Stylonychia* reported that cirri arise from the ectoplasm, being at once fully developed. In the final step of development of the organization areas in *Urostyla grandis*, the process of fusion of cilia and formation of cirri in this way may be observed.

In the more specialized *Hypotricha* (e. g. *Euplotes*) the section of a cirrus gives a satisfactory evidence that it is built up of cilia. In a more primitive form of this group like *U. grandis* even the process of fusion of cilia and formation of cirri in the ontogenesis may be observed.

Authors who studied the morphogenesis of ciliates stated the similitude of the 3 fundamental processes: division, physiological and post-traumatic regeneration. In *U. grandis* the only difference between those processes is that in the first process two areas of primordia arise one for each daughter individual, whereas in both types of regeneration only one primordial area is formed. In other *Hypotricha* the process is similar: e.g. in *Stylonychia* the number of primordial areas is the same in the physiological as in post-traumatic regeneration, but is doubled in division (Dembowska 1925, 1926). *Euplotes eurystomus* is an exception: two organization areas arise in this ciliate as well in division as in regeneration, but in the last case only the anterior area is developing and the posterior one disappears (Yow 1958).

In the present study, the similitude between the physiological regeneration and division was stressed. In the early stages those two processes can hardly be distinguished. It deserves attention that during division the anterior organization area precedes in its development the posterior one. It might be assumed that the anterior area is acting as an inhibitor upon the posterior which starts developing only after a period necessary „to liberate

itself" from the influence of the anterior area. In normal conditions, the posterior area is developing and the division follows. However any physiological stimulus is able to disturb the normal division process and then, instead of division, the physiological regeneration occurs. So it might be assumed that regeneration is a defective division which could not come to its conclusion. Deciding arguments in this problem might be provided by the study of the nuclear apparatus in physiological regeneration.

The similitude of cirri formation in division and in the physiological and also the post-traumatic regeneration indicates that the same series of morphogenetical phenomena may be evoked by numerous different factors or — that there exists one morphogenetical mechanism which can be set in motion by different factors.

Since the primordial areas appearing during division, physiological and post-traumatic regeneration show no differences between one another, it seemed adequate to call them with the same term: „organization area”.

It was stated in the experiments on regeneration in *Urostyla grandis*, presented in this study, that the fragments with the removed peristome regenerated much quicker than those in which the peristome was left. Similar results were reported by Hashimoto 1961 in his study on the regeneration in *Oxytricha fallax*. Above observations confirm the theory of Weisz 1951 about the inhibiting action of old oral parts upon the formation of new elements.

In *Hypotricha* investigated up to present time, removing of one cirrus involves the reconstruction of the whole body ciliature, as proved by the study of Dembowska 1925, 1926 on *Stylonychia*, *Uronychia* and others, as well as by the results of Yow 1958 on *Euplotes eurystomus*. All those investigations concerned the ciliates with a high reduction and considerable specialization of cirri which could be conveniently removed. In *Urostyla grandis*, on the contrary, elimination of single cirri with usual methods presents such difficulty that it is practically impossible. Amputation of small fragments of the body with several cirri involves no regeneration. In such ciliates the wound heals and the removed cirri develop only during division. If the operation line runs near the medial sector of the body, regeneration occurs. The time after which the regeneration begins is much shortened if the section is near the middle line of the body.

After cross section, the organization area arises always in the middle between the rows of the ventral cirri. Presumably this territory is the most morphogenetically active part of the cell.

Another problem is involved by the behaviour of ciliates operated during division. The study of Fauré-Fremiet 1910 on *Urostyla grandis* indicate the possibility of inhibiting the division in its early phase by cutting off parts of newly arising individuals. A fragment not yet detached from the future proter or opisthe is resorbed and, as result, one individual may be obtained. Hashimoto 1961 in his study on inhibition of division in *Oxytricha fallax* brought forward the idea of resorption of the division area primordia and formation of regeneration area instead. When opisthe and proter are completely separated and, simultaneously the AZM of both is injured, the regression of division in *Oxytricha fallax* in a certain sense occurs.



The present studies on *Urostyla grandis* Ehrbg. confirm rather the possibility of inhibiting influence of regeneration upon division in the sense of the findings of Hashimoto 1961.

In a similar way the physiological regeneration may be inhibited by the injury of the cirri of one organization area.

#### Summary

In *Urostyla grandis* Ehrbg. 1838, in contrast to other *Hypotricha* studied, primordia of all the cirri arise in one region called by the author „the organization area”. In the ontogenesis of *Urostyla grandis*, formation of cirri by agglomeration and fusion of cilia was stated. Formation of new motoric organellae occurs in the same way in the three morphogenetic processes: division, physiological and post-traumatic regeneration.

During the physiological and post-traumatic regeneration a single organization area arises. During the post traumatic regeneration, the organization area arises sooner in the fragments without peristome. Division and regeneration may be inhibited by injuring the already existing primordia. Cirri spread from the new organization area which arose as result of the traumatic stimulus. They evoke resorption of the still remaining cirri of division and of regeneration.

#### STRESZCZENIE

W wyniku badań przeprowadzonych na *Urostyla grandis* Ehrbg. stwierdzono, że w odróżnieniu od innych badanych *Hypotricha* zawiązki wszystkich cirri powstają na jednym obszarze nazwanym przez autorkę „polem twórczym”. Stwierdzono, że w czasie ontogenezy *U. grandis* nowe cirri powstają drogą skupiania się i łączenia rzęsek. Powstawanie nowych organelli ruchowych odbywa się w taki sam sposób w trzech procesach morfogenetycznych: w czasie podziału, regeneracji fizjologicznej i regeneracji post-traumatycznej.

Podczas regeneracji fizjologicznej i post-traumatycznej powstaje pojedyncze pole twórcze. W czasie regeneracji post-traumatycznej pole twórcze powstaje szybciej we fragmentach pozbawionych peristomu. Procesy podziału i regeneracji można zahamować przez uszkodzenie istniejących już zawiązków. Cirri rozchodzące się z nowego pola twórczego powstałego na skutek bodźca traumatycznego powodują resorpcję pozostałych cirri podziałowych i regeneracyjnych.

#### REFERENCES

- Dembowska W. S. 1925: Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*. Arch. mikr. Anat. 104, 185—209.
- Dembowska W. S. 1926: Studies on the regeneration of *Protozoa*. J. exp. Zool. 43, 485—504.
- Dembowska W. S. 1938: Körperreorganisation von *Stylonychia mytilus* beim Hungern. Arch. Protistenk. 91, 89—105.
- Chatton E. et Seguela J. 1940: La continuité génétique des formations ciliaires chez les Ciliés au cours de la division. Bull. Biol. Fr. Belg. 74, 349—442.

- Fauré-Fremiet E. 1910: La division de l'*Urostyla grandis*. Expériences de mérotomie. Bull. Sci. Fr. Belg. 44, 215—219.
- Gelei J. 1929: Sensorischer Basalapparat der Tastborsten und der Syncilien bei Hypotrichen. Zool. Anz. 83, 275—80.
- Hashimoto K. 1961: Stomatogenesis and formation of cirri in fragments of *Oxytricha fallax* Stein. J. Protozool. 8, 433—442.
- Kahl A. 1932: Die Tierwelt Deutschlands. Teil 25. *Ciliata. Spirotricha*. Jena.
- Kuźnicki L. 1962: Badania nad odwracalną immobilizacją *P. caudatum* wywołaną przez niektóre narkotyki i sole nieorganiczne. Doctor Diss. (unpublished).
- Párducz B. 1952: Eine neue Schnellfixierungsmethode in Dienste der Protistenforschung und des Unterrichtes. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Pigoń A. 1956: Wielocukrowce w organizmie *Urostyla* w czasie życia aktywnego i encystacji. Acta Bioch. Pol. 3, 613—625.
- Pigoń A. 1960: Changes of enzyme activity during starvation and encystment of a Ciliate (*Urostyla*). Acta Biol. Cracov. 3, 59—70.
- Raabe H. 1946: L'appareil nucléaire d'*Urostyla grandis* Ehrbg. Partie I. Appareil micronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska, S. C 1, 1—34.
- Raabe H. 1947: L'appareil nucléaire d'*Urostyla grandis* Ehrbg. Partie II. Appareil macronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska S. C 1, 133—170.
- Roth L. E. 1956: Aspects of ciliary fine structure in *Euplotes patella*. J. Biophys. Bioch. Cytology (suppl.) 2, 235—242.
- Roth L. E. 1957: A electron microscope study of the cytology of the protozoan *Euplotes patella*. J. Biophys. Bioch. Cytology 3, 985—1000.
- Tittler J. A. 1935: Division, encystement and endomixis in *Urostyla grandis* Ehrenberg with an account of an amiconucleate race. La Cellule 44, 189—218.
- Turner J. P. 1933: The external fibrillar system of *Euplotes* with notes on the neuromotor apparatus. Biol. Bull. 64, 53—66.
- Wallengren H. 1902: Zur Kenntnis der Neubildungs- und Resorptionsprozesse bei den hypotrichen Infusorien. Zool. Jahrb. Abt. Anat. der Tiere 15.
- Weisz P. B. 1951: A general mechanism of differentiation based on morphogenetic studies in ciliates. Am. Naturalist 85, 293—311.
- Yow F. W. 1958: A study of the regeneration pattern in *Euplotes eurytomus*. J. Protozool. 5, 84—88.

#### EXPLANATION OF PLATES I—IV

##### Formation of new cirri during division

- 1: Formation of organization area (10×45), 2: Anterior area developed (10×45), 3: Beginning of constriction. The anterior and posterior areas developed (10×25), 4: Posterior individual after division (10×25).

##### Formation of new cirri in physiological and post-traumatic regeneration

- 5: Organization area developed, 6: Ciliate after reorganization; migration of anal cirri, 7: Organization area developed in the posterior fragment, 8: Organization area developed in the anterior fragment (all 10×25).

##### Differentiation of the organization area. Formation of frontal cirri

- 9: Uniform streaks of cilia, 10: Beginning of fusion of the basal parts of cilia, 11: Fusion of cilia, 12: Formation of frontal cirri (all 10×60).

##### Differentiation of cirri

- 13: On the left body side, 14: On the right body side, 15: Migration of the transversal cirri, (all 10×60), 16: Distribution of protrichocysts and cirri (10×45).

(All photomicrographs after Parducz haematoxylin preparations).



1



2



3



4

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.



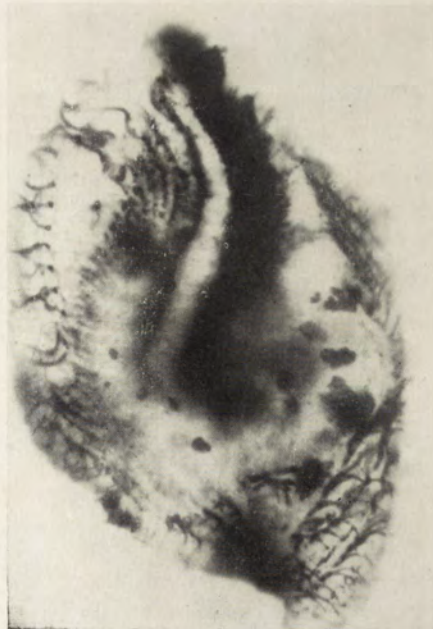
5



6



7



8

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.



9



10



11



12

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.



13



14



15



16

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.

Department of General Biology of the M. Nencki Institute of Experimental Biology,  
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Irena TOTWEN-NOWAKOWSKA

The effect of nutrition on the regeneration  
of the caudal body fragment in *Paramecium caudatum*

Wpływ odżywiania na regenerację tylnego odcinka ciała  
*Paramecium caudatum*

The influence of starvation upon the changes in the structure and function of organisms had been studied in numerous ciliates.

As a rule a certain period of starvation evokes a vacuolization of cytoplasm, resorption of superficial structures as well as vacuolization and desintegration of nuclei. Those processes bring about the death of the individual. According to the general opinion, ciliates when operated in conditions of starvation are not able to regenerate. It was stated so by Young 1922 in the genus *Uronychia*, Moore 1924 in *Spathidium spatula* Dujardin and others.

In contrast to the above mentioned authors, Sokoloff 1923 in the starved specimen of *Bursaria* found an acceleration of the regeneration process when compared with the individuals fed normally. Dembowska 1938 reported that lack of food evokes in *Stylonychia mytilus* Ehrbg. some processes similar to the regenerative reorganization following the operation.

In *Paramecium* which unlike the majority of ciliates may ingest food even when its cell is damaged, feeding seems to exert an essential influence upon regeneration.

The results reported in the literature of this subject are contradictory. Peebles 1912 and Tartar 1954 stated that starvation is inhibiting regeneration whereas Chejfec 1932 considers it as a factor promoting the regeneration ability of the ciliate.

In the present study an attempt was made to prove those two conflicting theories by an experimental examination whether the correlation between the amount of food ingested and regeneration in *Paramecium caudatum* really exists and in what degree it may manifest.

The research was carried out under the direction of prof. dr. J. Dembowski to whom I wish to express my most hearty thanks for his valuable suggestions. I wish also to thank dr. M. Doroszewski for his help and protection during the course of my research.

## Material and methods

As material the clones of *Paramecium caudatum* cultivated in our laboratory for many years were used. The ciliates were kept in the lettuce infusion inoculated with *Aerobacter aerogenes*. For the experiments with food dosage *Staphylococcus aureus* was applied as more fit for quantitative study owing to its uniform size and regular shape. All the bacterial clones were provided by the Hydrobiology Department of the M. Nencki Institute of Experimental Biology.

Operations were executed with scalpels made of dentistic needles properly sharpened and adjusted. The posterior body fragment of *Paramecium* was cut off in the cytopharyngeal region. One hour after operation (this period was fixed as the criterion of survival) ciliates were placed in a watch glass or — for the vital observation — on slides with microchambers. Vital observations were carried out under the microscope in the temperature 18—21°C using the phase contrasting apparatus or the dark field.

The silverline system was revealed by silver nitrate impregnation technique of Klein 1926 and also that of Chatton et Lwoff 1936.

The ciliary system was stained with Párducz's 1952 haematoxylin method.

## Experiments

The vital observation proved that the terminal tuft of long stiff cilia forming the tail (cauda) in *Paramecium*, may appear before the regeneration is completed. The new primordium was seen to appear near the wound on the dorsal side of the ciliate body, opposite the peristomal depression. The presence of this primordium was recognized as the indicator of the beginning of the regeneration process. As the criterion of the regeneration process being completed, the pre-operation shape of the ciliate was recognized as well as the presence of the terminal caudal cilia.

Experiments were carried out on 3 groups of individuals in different state of satiation with nourishment before and after operation.

### Group I. Ciliates kept in the medium rich in food

Before and after operation ciliates were kept in the nutrient containing bacterial food in excess. For treatment were selected individuals of a high degree of satiation i.e. containing vacuoles filled with ingested substance. Before operation those individuals divided once or twice in 24 h. After operation they were left in their medium rich in food. The medium was changed every day.

Out of 300 individuals operated about 120 survived. The caudal tuft appeared approx. 24 h after operation, independently from the divisions occurring in this period. As the severed part of the cell simultaneously grew and gradually became rounded, the primordium of the caudal tuft which primarily appeared near the severed spot, gradually shifted to its proper place at the end of the body. There proved to occur considerable individual diffe-



rences in the rate of growth (1—3 days) of the injured part of the cell and in the number of divisions (1—3) occurring before completion of regeneration (Fig. 1).

Group II. Ciliates kept in the medium with scarce food

Chejfec 1929 stated that the gradual reduction of bacterial content (*Bacterium coli*) in the medium may inhibit the divisions in *Paramecium* while the normal physiological function persist; e.g. if the bacterial concen-

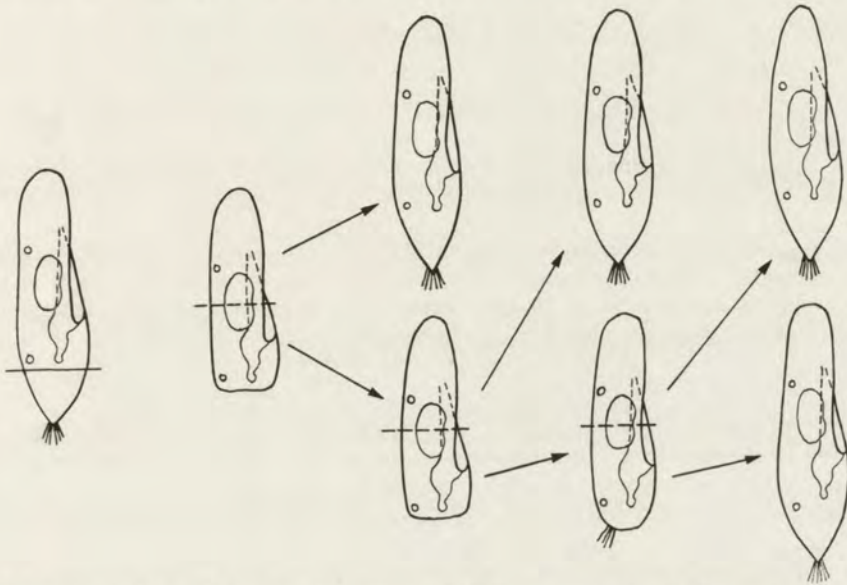


Fig. 1. Regeneration of the caudal ciliary tuft in a normally dividing *Paramecium*

tration falls below 2 000/ml of water, the first division may be inhibited for 30 days. A further reduction of bacterial amount in the medium may prolonge this period up to over 120 days.

Following the Chejfec's method, the author delayed the first division for 5—7 days when the daily dose of bacteria — *Staphylococcus aureus* — was about  $5 \cdot 10^3$ /ml of water. The count of bacteria was made in the Thom-Zeiss chamber. Prior to operation ciliates were rinsed in dechlorized tap water and subsequently kept there for 24 h. After this treatment ciliates were placed in 1 ml of medium with a defined content of bacterial cells. The medium was changed every day. About 240 individuals out of 300 operated survived.

Regeneration proceeded while division was inhibited (Fig. 2). The caudal, cilia appeared like in the I group after 24 h whereas the growth and regulation of the cell shape was delayed and lasted sometimes 5—7 days.

Group III. Ciliates kept in a medium devoid of food

Individuals of this group were starving for 5—7 days. After the treatment they were kept in tap water. 60 specimen out of 300 operated survived.

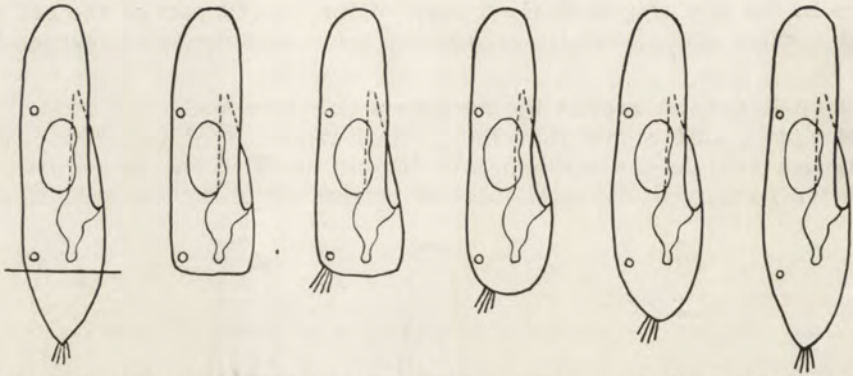


Fig. 2. Diagram of regeneration in *Paramecium caudatum* in the case of inhibited division

To this group 16 individuals originating from the experimental group II were included. They could not take food because their cytotome was injured by the treatment. Like in the former experimental groups, the primordium of caudal tuft appeared in the individuals with the complete or injured

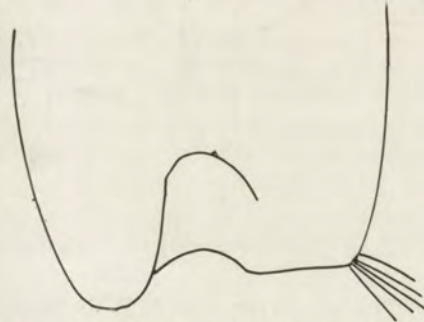


Fig. 3. Regeneration of the caudal ciliary tuft in a starving individual with injured cytotome

cytotome 24 h after operation. During the whole period of starvation, the operated individuals of the III group kept their deformed shape, failed to grow and did not manifest any changes which could indicate the return to their normal conditions (Fig. 3).

The ciliates which after the appearance of their tail primordium were transferred into the nutrient, regenerated like those of the group I and II provided that their cytotome was not injured.

#### Discussion

Mortality of the post-operation individuals of *Paramecium caudatum* is very high. Calkins 1911 and Peebles 1912 considered this species to be a poor regenerator and Hosoi 1937 obtained no single case of regeneration

in this ciliate. Tartar 1939 called attention to the importance of discriminating two processes occurring after operation: 1. survival after the post-operation shock and 2. the regeneration itself. According to this author all the individuals which survived after operation and have their nuclear apparatus, are able to regenerate. He stressed that nutrition after treatment is essential for the normal course of regeneration process (Tartar 1954). He denied the opinion of Chejfec 1932 that starvation stimulates the regeneration in *Paramecium*.

It was stated in the present study that in the individuals subjected to starvation for 1—2 days prior to operation, the post-treatment mortality was decidedly lower than in those satiated with food. A more prolonged starvation — over 5—7 days — evokes a new increase of mortality.

Starvation after the treatment causes, as a rule, an inhibition of the regeneration process. Since in *Paramecium* the cytostome fails to regenerate (Tartar 1954) the regeneration process is limited only to the ciliary system, contractile vacuoles and cytoplasm. In normal conditions, the regeneration of this ciliate is mostly accomplished only after 1—3 divisions (Peables 1912). The first division results in two daughter individuals of different characters. After the operation of the terminal fragment of the body, the proter shows a normal structure, whereas the opisthe is deformed. The return of the opisthe to its normal shape and size, as well as its division into two identical individuals, are generally looked upon as the sign of the regeneration being accomplished.

Changes occurring in the ciliary system after the operation in normal conditions were studied by Courtney et Mugard 1958. They proved that approx. 4 h after operation the number of kinetosomes increases and they become elongate. This process is most intensely marked 4—8 h after operation and then is slowing gradually. About 28 h after operation the regeneration of the ciliary system is completed.

A plain densification of kinetosomes near the severed place has never been found in the course of the present study. Such a densification would indicate that the regeneration of cilia is very limited in this place.

The new caudal tuft was noticed on the dorsal side about 24 h after the treatment as well in the individuals with a complete cytopharynx as in those with an impaired one. After the ciliates had been transferred into the nutrient medium, the growth of the injured part of the cell and the gradual restitution of its normal shape started, then the primordium of the tuft shifted to its normal place at the end of the body. In contrast to this, in specimen with an injured cytopharynx the regulation of the body shape failed to occur, and caudal tuft remained at the place where it appeared originally for as long a time as the regenerated ciliate was observed. The formation of cauda in a definite region of the ciliate body before the regeneration of the terminal part has occurred, suggesting that the tail is a special structural element. The tail cilia occurring in all the *Paramecium* species are situated either at the posterior end of the body as in the group of *P. aurelia*: *P. caudatum* Ehrenberg, *P. aurelia* Müller, *P. multimicronucleatum* Powers-Mitchell (Wenrich 1928), or on the dorsal side of the flattened body opposite the peristomal depression as in the group of *P. bursaria*: *P. bursaria* Focke, *P. polycarium* Woodroff-Spen-

cer, *P. trichium* Stokes, *P. woodruffi* Wenrich (Wenrich 1928), *P. arcticum* Doroszewski (Doroszewski 1959).

The position of the caudal primordium in the regenerating *P. caudatum* would correspond to its normal place in the individuals of the *P. bursaria* group.

It seems possible that in *Paramecium*, on the side opposite the peristomal depression a definite sector exists in which arise the caudal cilia.

### Conclusions

In the individuals starving for 1—2 days prior to operation, the post-operation mortality is distinctly lower than in those satiated with food.

A prolonged starvation (over 5—7 days) prior to operation evokes the increase of mortality again.

Starvation following the operation causes inhibition of the regeneration process.

The new primordium of caudal ciliary tuft appears in *Paramecium* independently from the degree of satiation with nourishment even in the individuals with a cytopharynx cut off.

The primordium of caudal tuft appears on the dorsal side in a definite place of the body and shifts subsequently backwards to its normal position when the regulation of the shape of the cell proceeds.

The location of the caudal cilia in regenerating *Paramecium caudatum* shows a certain resemblance to the position of this structure in the species with the flattened body.

Formation of the caudal primordium before the regeneration of the posterior region is completed, suggests the possibility that the caudal ciliary tuft is a special element of the superficial structure in the genus *Paramecium*.

### STRESZCZENIE

Doświadczenia były przeprowadzone na trzech grupach osobników *Paramecium caudatum* Ehrbg., różniących się między sobą stopniem nasycenia pokarmem przed operacją i po operacji. Stwierdzono, że nowy zawiązek rzęsek ogonka powstaje na dorsalnej stronie ciała wymoczka, w pobliżu miejsca zranienia, zarówno u osobników głodzonych, jak i u karmionych po operacji. Zawiązek ten ulega stopniowemu przesunięciu na miejsce swego normalnego położenia, ku tylnemu końcowi komórki, w trakcie regulacji jej kształtu. Pojawianie się zawiązka rzęsek ogonka zanim nastąpi całkowita regeneracja tylnego końca ciała *Paramecium*, wskazuje na możliwość uznania ich za odrębny element struktur powierzchniowych.

## REFERENCES

- Calkins G. N. 1911: Effects produced by cutting *Paramecium* cells. Biol. Bull. 21, 36—72.
- Chatton E. et Lwoff A. 1936: Techniques pour l'étude des Protozoaires, spécialement de leurs structures superficielles (cinétome et argyrome). Bull. Soc. Franc. Micr. 5, 25—39.
- Chejfec M. 1929: Długość życia *Paramecium* w związku z odżywianiem. Acta Biol. Exp. 4, 73—118.
- Chejfec M. 1932: Regulacja i regeneracja u *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Exp. 7, 115—134.
- Courtesy B. et Mugard H. 1958: Observations sur la régénération et division simultanées de *Paramecium caudatum*. Bull. Biol. 42, 210—232.
- Dembowska W. 1938: Körperreorganisation von *Stylonychia mytilus* beim Hungern. Arch. Protistenk. 91, 89—105.
- Doroszewski M. 1959: *Paramecium arcticum* sp. nov. Bull. Ac. Pol. Sci 7, 73—77.
- Hosoi T. 1937: Protoplasmic streaming in isolated pieces of *Paramecium*. J. Fasc. Sci. Univ. Tokyo (IV-Zool.) 4, 299—305.
- Klein M. B. 1926: Ergebnisse mit einer Silbermethode der Ciliaten. Arch. Protistenk. 56, 249—279.
- Moore E. L. 1924: Regeneration at various phases in life history of *Spathidium spatula* and *Blepharisma undulans*. J. Exp. Zool. 39, 249—316.
- Párducz B. 1952: Uj györgrítő eljárás a volykutatás ésaktátos szalgásatában. Eine neue Schnellfixierungsmethode in Dienste der Protistenforschung und des Unterrichtes. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Peebles F. 1912: Regeneration and regulation in *Paramecium*. Biol. Bull. 23, 154—170.
- Sokoloff B. 1923: Das Regenerationsproblem bei Protozoen. Arch. Protistenk. 47, 143—252.
- Tartar V. 1939: The so-called racial variation in the power of regeneration in *Paramecium*. J. Exp. Zool. 81, 181—208.
- Tartar V. 1954: Anomalies in regeneration of *Paramecium*. J. Protozool. 1, 11—17.
- Wenrich D. H. 1928: Eight well defined species of *Paramecium*. Trans. Am. Microscop. Soc. 47, 274—282.
- Young D. B. 1922: A contribution to the morphology and physiology of the genus *Uronychia*. J. Exp. Zool. 36, 353—395.



Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Маклина 32  
Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR,  
Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32

Е. М. ХЕЙСИН, Л. П. ОВЧИННИКОВА, Г. В. СЕЛИВАНОВА, Э. Г. БУЗЕ  
E. M. CHEISSIN, L. P. OVCHINNIKOVA, G. V. SELIVANOVA, E. G. BUZE

### Изменение количества ДНК в макронуклеусе *Paramecium caudatum* в период от деления до деления

Changes of the DNA content in the macronucleus of *Paramecium caudatum* in the interdivisional period

Различными исследователями было показано, что синтез ДНК в макронуклеусе (Ма) инфузорий, так же как и в ядрах многих клеток *Metazoa* происходит в течение интерфазы. Соответственно, в это время происходит удвоение количества ДНК. Одни авторы при исследовании инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Prescott 1960 и др.) указывают, что синтез начинается уже в первую половину или в начале интерфазы, другие (Walker and Mitchisson 1957, Gall 1959, Kimball and Barca 1959, Kimball, Vogt-Köhne and Caspersson 1960, Kimball and Vogt-Köhne 1961) при изучении разных видов инфузорий (*Paramecium caudatum*, *P. aurelia*, *Euplotes*) считают, что этот процесс осуществляется во вторую половину или даже в конце интерфазы. Наконец, приводятся данные, полученные при изучении *Tetrahymena pyriformis* и *Stentor coeruleus* что синтез ДНК осуществляется постепенно в течение всего периода интерфазы (Mc Donald 1958, 1960, Walker and Mitchisson 1957), занимая иногда до 90% всего времени между двумя делениями (Guttес and Guttес 1960). Все эти данные полученные разными методами (ультрафиолетовая микроспектрометрия, микрофотометрия в видимой области спектра, автордиография) не могут считаться исчерпывающими и не дают еще возможности делать общие выводы о закономерностях этого явления. Следует особенно отметить, что даже при исследовании одного объекта (напр. *Tetrahymena*) разные авторы получали не одинаковые результаты (Mc Donald 1958, Prescott 1960). Какими условиями определяется время наступления синтеза ДНК в тот или иной момент интерфазного периода еще не установлено. Между тем, вопрос о времени удвоения ДНК в интерфазе имеет большое значение для выяснения связи этого процесса с ростом, делением и дифференцировкой клетки, а также с теми морфологическими изменениями, которые претерпевает Ма, как полиплоидное, трофическое ядро, в цикле от деления до деления. Поэтому мы и начали исследование методом ультрафиолетовой микрофотометрии, изменений количества ДНК в Ма в разные моменты между двумя делениями у различных инфузорий, для получения сравнительных данных. В данной статье приводятся лишь материалы по изучению *P. caudatum*.

## Материалы и методика исследования

Работа проведена на одном клоне *P. caudatum*, который культивировался в пробирках на стандартной среде Лозина-Лозинского. Пищей служили дрожжи. Из основного клона пипеткой вылавливались инфузории и помещались индивидуально в той же питательной среде в небольшие микроаквариумы. После деления инфузории, каждая дочерняя особь выдерживалась определенный срок при постоянной температуре 22°, после чего фиксировалась и исследовалась на микроспектрофотометре. При 22° деление повторялось через каждые 18½—19 часов. Количественные исследования ДНК в Ма производились сразу же после расхождения двух дочерних особей, затем через 1 час до 4-х часов и далее через каждые 2 часа до 18 часов. Затем инфузории фиксировались через каждые 10 минут в течение 30 минут, когда осуществлялось деление самой инфузории.

Фиксация производилась 4% нейтральным формалином. Для измерения количества ДНК в Ма, производилась экстракция РНК из ядра и цитоплазмы 1N HCl при температуре 60° в течение 20 минут или рибонуклеазой. Эта методика более подробно описана в работе Овчинниковой, Селивановой и Хейсина 1962. Следует отметить, что в нашей предыдущей работе мы не фиксировали инфузорий формалином. Вероятно поэтому цифры, полученные в данном исследовании, определяющие количество ДНК, оказались несколько более низкими, чем соответствующие показатели, полученные при исследовании не фиксированных инфузорий.

Исследование производилось фотографическим методом с ультрафиолетовым микроскопом (МУФ-6) в длине волны 265 мμ с последующей фотометрией негативов. Всего исследовано 351 инфузория.

## Результаты исследования

Только что разделившиеся инфузории или еще не успевшие полностью разделиться и соединенные тонким плазматическим мостиком имеют Ма с наименьшим количеством ДНК ( $Q = 1.11 \times 10^{-5}$ )<sup>1</sup>. У разных особей количество ДНК варьирует от 0.77 до 1.38, т.е. разность между крайними величинами достигает почти двукратных размеров (табл. 1).

Как видно из Таблицы 1 и рис. 1, количество ДНК в Ма сохраняется на постоянном низком уровне в течение 8—10 часов при температуре 22°. Начиная с 10-го часа количество ДНК в Ма несколько увеличивается (ср.  $Q = 1.28$ ). Это связано с началом синтеза ДНК в Ма некоторых инфузорий. Если в первые 8 часов наибольшее количество ДНК не превышало 1.56, то через 10 часов появились инфузории, у которых в Ма количество ДНК увеличилось до 1.70. В тоже время и минимальное количество ДНК увеличилось с 0.72—0.78 до 0.83. На этом уровне количество ДНК сохраняется еще в течение 4 часов. К 18 часу начинается значительное увеличение количества ДНК в Ма. В среднем количество ДНК достигает 1.76 при минимальном количестве 1.37 и максимальном 2.51 у разных инфузорий. Фактически у некоторых инфузорий к этому времени происходит уже удвоение количества ДНК. Однако, у большинства инфузо-

<sup>1</sup> Данные о количестве ДНК даются в относительных единицах. Коэффициент  $10^{-5}$  опускается.



Таблица 1

Изменение площади (S) Ма и количества ДНК (Q) от деления до деления у *P. caudatum*

Часы после деления	$Q \times 10^{-5}$ минимум	$Q \times 10^{-5}$ максимум	$Q \times 10^{-5}$ среднее	$S \times 10^{-5}$ см <sup>2</sup>	Количество инфузорий	Примечания
0	0.77	1.38	1.11	1.04	36	
1 h	0.72	1.34	1.03	0.90	27	
2 h	0.78	1.29	1.04	1.03	27	
3 h	0.73	1.37	1.01	0.96	26	
4 h	0.76	1.26	1.05	1.01	24	
6 h	0.76	1.56	1.12	1.13	27	
8 h	0.76	1.43	1.14	1.11	25	
10 h	0.83	1.70	1.28	1.09	26	
14 h	0.93	1.76	1.34	1.24	24	
16 h	1.00	2.02	1.32	1.25	28	
18 h	1.37	2.51	1.76	1.63	17	
18 h 10'	1.48	2.58	1.95	2.61	10	Ма с перетяжкой.
18 h 20'	1.28	3.46	2.25	2.22	24	Ма разделился не полностью.
18 h 30'	0.77	1,62	1.12	1.05	30	Полное разделение Ма и незаконченная перешнуровка тела инфузории.

рий синтез ДНК продолжается еще и после 18 часов. В это время происходит удлинение тела инфузории и вытягивание макронуклеуса. Микронуклеус оказывается уже разделившимся. В течение 30 минут наблюдается быстрое образование поперечной перетяжки тела и разделение инфузории на две дочерние особи. Ма при этом сильно вытягивается и к 18 часам 10 минутам между сестринскими Ма образуется тонкий связующий мостик, который разрывается через 10 минут и к 18 часам 30 минутам Ма полностью изолируются в дочерних особях.

Как видно из Таблицы 1 количество ДНК продолжает нарастать в делящихся Ма и достигает максимума к 18 часам 20 мин., т.е. перед самым моментом разделения инфузории. Во всех инфузориях происходит удвоение количества ДНК. В среднем количество ДНК равно 2.25. Если в первые 8 часов после деления, когда не происходило синтеза ДНК его количество вариировало у разных инфузорий от 0.72 до 1.56, то перед самым делением вариация наблюдалась в пределах от 1.28 до 3.0 и только у одной инфузории было обнаружено в Ма ДНК равное 3.46. Таким образом, эти показатели ясно свидетельствуют об удвоении ДНК в самом конце интерфазы. После того как сестринские Ма обособятся и инфузория почти полностью перешнуровывается, в каждом Ма оказывается столько же ДНК, сколько его было у только что разделившихся особей. Размеры Ма после

деления наименьшие (рис. 2). На протяжении 10 часов площадь ( $S$ ) Ма почти не увеличивается, но уже к 14 часу происходит некоторое ее увеличение с 1.1 до 1.24.<sup>2</sup> Особенно интенсивное увеличение Ма происходит к 18 час., когда его площадь достигает уже 1.62 см<sup>2</sup> и еще через 10 минут Ма вытягивается и его площадь увеличивается до 2.6 см<sup>2</sup>. В это время оба сестринских ядра обособляются и их размеры быстро уменьшаются. Следовательно, время начала синтеза ДНК в Ма совпадает с ростом ядра.

Образовавшиеся после деления сестринские Ма, как правило, имеют одинаковое или близкое количество ДНК. Мы измерили 30 пар Ма и обнаружили, что Ма передней особи имеет 1.08 ДНК, а задней особи — 1.012. Различие в боль-

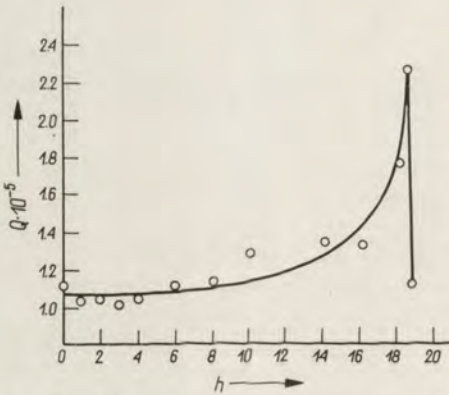


Рис. 1. Изменение количества ДНК в Ма *P. caudatum* от деления до деления

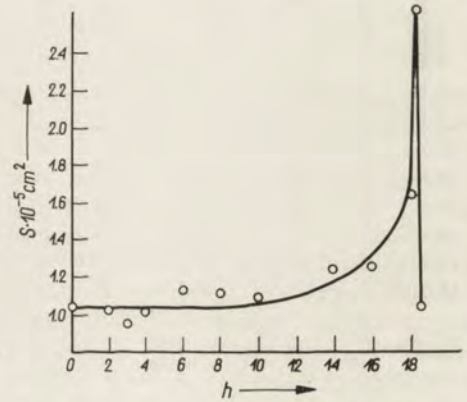


Рис. 2. Изменение площади Ма *P. caudatum* от деления до деления

шинстве случаев не превышает 0.01—0.21 относительных единиц и лишь в одном случае Ма передней особи содержало ДНК на 0.8 больше, чем Ма задней особи. В данном случае было резкое неравномерное деление, причем, один Ма по содержанию ДНК в два раза превышал другой Ма. В остальных случаях различие между сестринскими Ма в количестве ДНК не превышало 20%.

#### Обсуждение результатов

Данные ультрафиолетовой микроспектрофотометрии показывают, что у *P. caudatum* синтез ДНК в Ма начинается во второй половине интерфазы и идет наиболее интенсивно перед самым концом деления Ма и самой интерфазы инфузории. Около 55%—60% времени интерфазы занимает период „покоя” и следовательно, процесс синтеза ДНК охватывает около 40%—45% оставшегося времени. Таким образом, наши наблюдения в общем сходны с исследованиями других авторов, проведенными над *P. caudatum* (Walker and Mitchison 1957) и над *P. aurelia* (Kimball and Varca 1959, Kimball, Vogt-Köhne and Caspersson 1960). Однако, у *P. caudatum*, по нашим наблюдениям, синтез ДНК сдвигается на самый конец второй половины интерфазы, тогда как

<sup>2</sup> Площади инфузорий даются в см<sup>2</sup>, множитель 10<sup>-5</sup> опускается.

у *P. aurelia* происходит, повидимому, быстрое нарастание количества ДНК уже в начале второй половины интерфазы. Во вторую половину интерфазы начинается также и прохождение реорганизационной полоски в лентовидном *Ma Euplotes*. Её прохождение, как было показано методом автордиографии (Gall 1959), связано с синтезом ДНК. Анализируя сроки наступления синтеза ДНК у разных инфузорий и время его наибольшей интенсивности, можно заметить, что при укорачивании интерфазного периода происходит некоторый сдвиг во времени наиболее интенсивного синтеза к середине интерфазы, тогда как синтез во всех случаях начинается приблизительно в одно время, а именно в середине интерфазы. Действительно, у *P. caudatum* при 22° интенсивный синтез идет в самом конце интерфазы, а при 27°, с 10 часовой длительностью интерфазы, усиленный синтез начинается уже в самом начале второй половины интерфазы и заканчивается незадолго до деления (Walker and Mitchisson 1957). То же самое наблюдается и у *P. aurelia* при 5–6 часовом интервале между делениями.

В этом отношении показательны наблюдения над *Tetrahymena pyriformis*, темп деления которой равен 4 часам при 27°. Может быть коротким интерфазным периодом объясняется (Prescott 1959) тот факт, что синтез ДНК у этих инфузорий уже начинается сразу же после окончания деления и, по мнению Prescott, завершается в первой половине интерфазы, или по данным Walker and Mitchisson 1957 и McDonald 1958 протекает на протяжении всей интерфазы, обнаруживая максимум к ее середине. Однако, имеются данные Guttес and Guttес 1960 по *Stentor coeruleus* свидетельствующие, что у этой инфузории с 30 часовым периодом между делениями происходит непрерывный процесс синтеза ДНК на протяжении 90% времени интерфазы, так же как у *Tetrahymena* с ее коротким интерфазным периодом. Поэтому делать какие-либо общие заключения по этому вопросу пока преждевременно; для этого необходимо иметь больший сравнительный материал.

Мы предполагаем, что начало синтетических процессов в *Ma* отчасти совпадает с активностью макронуклеуса (Ми). Начало его деления у *P. caudatum* падает на 10–12 часов интерфазного периода и заканчивается к 17–18 часам. Возможно, что его деление является толчком для начала синтеза ДНК в *Ma*. Между тем Walker and Mitchisson 1957 отмечают, что по их наблюдениям синтез ДНК в Ми начинается позже, чем в *Ma*. С другой стороны, Seshachar 1950 для *Chilodonella uncinata* отмечает обратную картину, когда синтез в Ми опережает синтез ДНК в *Ma*. Трудность количественного исследования Ми из-за их крайне малых размеров, не позволяет с достаточной достоверностью говорить о сроках синтеза ДНК в этом ядре и тем самым сопоставлять этот процесс с синтезом ДНК в *Ma*.

Наши наблюдения показывают, что синтез ДНК в *Ma* начинается немного раньше, чем появляются видимые признаки перешнуровки тела инфузории. Но наибольшая активность синтеза ДНК в *Ma* совпадает по времени с делением самой инфузории. Повидимому, эти два процесса непосредственно не связаны между собой.

Синтез ДНК у *P. caudatum* совпадает с периодом роста *Ma*. Последний начинает увеличиваться в размерах после 10 часового периода „покоя” после деления. Кривые интенсивности синтеза ДНК и увеличения площади *Ma* в интерфазе (рис. 1 и 2) вполне идентичны. В то же время рост клетки после деления пред-

шествует началу синтеза ДНК и увеличению размеров Ма. Это, вероятно, характерно для инфузорий с длительным интерфазным периодом (Guttес and Guttес 1960). У *Tetrahymena pyriformis* с коротким периодом интерфазы эти процессы совпадают во времени (Prescott 1959).

Весьма существенным фактом является вариабильность количества ДНК в Ма у инфузорий одного клона. Это было подмечено также и в отношении *P. aurelia* (Kimball and Barca 1959). Минимальные и максимальные показатели количества ДНК имеют почти двукратное различие как в начале интерфазы, так и в конце перед делением. Kimball and Barca 1959 предполагают, что это связано с неравномерным распределением ДНК среди сестринских Ма. По нашим наблюдениям большие различия в количестве ДНК в сестринских Ма наблюдаются сравнительно редко, гораздо чаще ДНК распределяется при делении более или менее равномерно и разность в количестве ДНК в сестринских Ма редко когда превышает 20%. Это совпадает с наблюдениями Mc Donald 1958 над *Tetrahymena pyriformis*. Возможно, что в пределах клона вариабильность количества ДНК в Ма возникает не в результате его неравномерного деления, а вследствие того, что деление Ма может наступать в разное время, независимо от того на сколько увеличилось в нем количество ДНК. Это вполне вероятно, так как наблюдаемое нами постепенное нарастание количества ДНК в Ма в конце интерфазы (рис. 1) обуславливается по-видимому тем, что не во всех геномах полиплоидного Ма одновременно происходят эндомитозы, во время которых осуществляется синтез ДНК. Несинхронность эндомитозов в разных геномах может привести к тому, что к моменту деления ядра, количество ДНК окажется не полностью удвоенным. Возможно также и задержка в делении в результате чего Ма достигает больших размеров чем обычно и после деления образуются ядра с увеличенным количеством ДНК. По-видимому, только этим можно объяснить почему среди исследованных нами инфузорий были такие, у которых перед делением Ма содержал сравнительно низкое (1.28) или очень высокое (3.46) количество ДНК.

Наличие значительных вариаций в количестве ДНК в Ма инфузорий одного клона, характерно только для полиплоидного ядра, где изменения количества ДНК в течение вегетативной жизни инфузории не отражаются существенно на жизнедеятельности особей. При этом можно предположить, что изменение количества ДНК связано с некоторым изменением степени плоидности Ма. Однако для уточнения этого вопроса нужны дальнейшие исследования.

#### Резюме

Приводятся данные, полученные методом микроспектрофотометрии в ультрафиолетовых лучах с длиной волны 265 мμ по изменению количества ДНК в Ма на разных стадиях между делениями у *Paramecium caudatum*. Интерфазный период при температуре 22° длится 18½—19 часов. В течение 10—12 часов (период покоя) количество ДНК в Ма не увеличивается, также как площадь Ма в это время не изменяется. Синтез ДНК начинается на 14 часу интерфазного периода, резко усиливается к 18 часам, достигая максимума перед самым делением инфузории (18 h. 10'—18 h. 20'). В это время количество ДНК удваивается, также как площадь Ма увеличивается в 2 раза. Рост тела инфу-

зории после деления предшествует началу синтеза ДНК. Сестринские Ма имеют, как правило, одинаковое количество ДНК. Вариации количества ДНК, вероятно, обуславливаются тем, что деление Ма наступает при различной степени пloidности. Это связано с несинхронностью эндомитозов в различных геномах.

## SUMMARY

Quantitative measurements of the DNA content in the macronucleus of *Paramecium caudatum* at different stages between two successive divisions were executed by microspectrophotometry in ultraviolet light at 265 m $\mu$  of wave length. In 22°C the interphase lasts 18.5—19 h. Within the initial 10—12 h, the DNA content in macronuclei fails to increase and the area of the macronucleus also remains unchanged. The DNA synthesis begins in the 14th hour of interphase; then the DNA content increases sharply reaching its maximum in the 18th hour, just before division. At this time quantity of DNA is doubled as well as the area of macronuclei. After division the DNA synthesis is preceded by growth of the infusorium body. Sister macronuclei as a rule, comprise equal quantity of DNA. Variations in the content of DNA is probably due to the fact that division of Ma occurs at different degree of ploidy. It is connected with the asynchrony of endomitosis in different genoms.

## ЛИТЕРАТУРА

- Gall J. G. 1959: Macronuclear duplication in the ciliated protozoan *Euplotes*. J. Bioph. Bioch. Cyt. 5, 295—308.
- Guttes E. and Guttes S. 1960: Incorporation of tritium-labelled thymidine into the macronucleus of *Stentor coeruleus*. Exp. Cell Res. 19, 626—628.
- Kimball R. F. and Barca T. 1959: Quantitative cytochemical studies on *Paramecium aurelia*. II. Feulgen microspectrophotometry of the macronucleus during exponential growth. Exp. Cell Res. 17, 173—182.
- Kimball R. F., Vogt-Köhne L. and Caspersson T. 1960: Quantitative cytochemical studies on *Paramecium aurelia*. III. Dry weight and ultraviolet absorption of isolated macronuclei during various stages of the interdivision interval. Exp. Cell Res. 20, 368—377.
- Kimball R. F. and Vogt-Köhne L. 1961: Quantitative cytochemical studies on *Paramecium aurelia*. IV. The effect of limited food and starvation on the macronucleus. Exp. cell Res. 23, 479—487.
- McDonald B. 1958: Quantitative aspects of desoxyribose nucleic acid (DNA) metabolism in an amiconucleate strain of *Tetrahymena*. Biol. Bull. 114, 71—94.
- McDonald B. 1960: Time of DNA synthesis in macro and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 7 (suppl), 10.
- Овчинникова Л. П., Селиванова Г. В., Хейсин Е. М. 1963: Исследование методом УФ-цитотометрии влияния голодания на количество ДНК и РНК у *Paramecium caudatum*. Сборник „Морфология и физиология простейших“ 3. Изд. АН СССР (в печати).
- Prescott D. 1960: Relation between cell growth and cell division. IV. The synthesis of DNA, RNA and protein from division in *Tetrahymena*. Exp. Cell Res. 19, 228—238.
- Seshachar B. R. 1950: The nucleus and nucleic acids of *Chilodonella uncinatus* Ehrbg. J. Exp. Zool. 114, 517—544.
- Swift H. 1950: Desoxyribonucleic acids content of animal nuclei. Physiol. Zoöl. 23, 169—200.
- Walker P. M. B. and Mitchisson J. M. 1957: DNA synthesis in two ciliates. Exp. Cell Res. 13, 167—173.



Department of General Biology of the M. Nencki Institute of Experimental Biology,  
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Maria BRUTKOWSKA

## Effect of pH on the food vacuole formation in *Paramecium caudatum*

Wpływ pH na tworzenie wodniczka pokarmowego u *Paramecium caudatum*

Although the question of the effect of pH on *Paramecium* has received considerable attention over the past decades, little is known regarding the mechanism by which pH influences its food ingestion. Metalnikov 1912 was among the first writers to show that the formation of food vacuoles depends upon changes of the H ion concentration. Since Metalnikov's method was, however, not sufficiently accurate for quantitative studies, some of his conclusions required revision. More recently, Mills 1931 and Lee 1942 investigated the food vacuole formation in *Colpidium* and *Paramecium* respectively. Despite the fact that their experimental observations were made on different species, their approaches were very similar. In view of experiments carried out in this laboratory by Grębecki and Kuźnicki 1956, Mills' and Lee's method should, however, also be subject of criticism. First, the authors placed the ciliates together with their culture medium into a new environment, and no caution was exercised with regard to the maintenance of the level of the H ion concentration. Moreover, they defined the pH for the basic buffer solutions, but failed to do this for the experimental medium. Furthermore, it is likely that the Indian ink, employed as the food material in their experiments, interacted with some components of their solutions, and thereby influenced in some way the shape of the food vacuoles (Dogiel und Issakowa-Keo 1927). In consequence, a meaningful quantitative evaluation of the food vacuole formation was not possible. Also, the procedure of determination of the number of vacuoles on dead ciliates, which was the case in their studies, is by far less precise than that for living animals. Due to a more or less pronounced contraction of the cytoplasm in dead ciliates the picture does not permit reliable estimation of the food vacuole formation. Finally, their buffer solutions were not enough uniform in their ion composition to be certain that the number of vacuoles formed was dependent solely on pH. Mast and Fennel 1938 found great differences in food intake of *Amoeba* under circumstances under which, at constant pH, the ion composition of the medium was changed. In favour of Mills' and Lee's investigations it should be added, however, that, practically, it is almost impossible

to obtain buffer solutions over wide range of pH without alterations in their ion composition.

This paper attempts to clarify further the effects of pH on food ingestion and food vacuole formation in *Paramecium caudatum*.

#### Material and methods

Experiments were carried out on *Paramecium caudatum* stock which has been cultivated in this laboratory.

##### Preparation of *Paramecium* suspension

The paramecia were grown in a mass culture on standard lettuce infusion<sup>1</sup> inoculated with an *Aerobacter aerogenes* strain 24 hours before using (Sonneborn 1950). A day prior to the experiment they were transferred through 2 successive washes of the 1:4 buffer solution of pH = 7.10 prepared according to Dryl 1959b. Due to the negative geotaxis the paramecia after washing formed a suspension containing approximately 5 000 to 6 000 specimens per 1 ml of the buffer solution. Under these conditions, all food vacuoles, which had been formed following ingestion of the bacteria, were separated within 1 to 2 hours.

##### Preparation of buffer solutions

In all instances, the buffer solutions were composed of three basic substances: calcium chloride 1 mM, sodium citrate 1 mM, and sodium phosphate mono- or dibasic 1 mM (Dryl 1961). The acid range was achieved by addition of citric acid, whereas for alkaline range, boric acid and sodium hydroxide in variable concentrations were used. The pH values were checked with the Cambridge Instrument Co. potentiometer.

##### Food materials

During testing the animals were allowed to ingest one of the following suspensions:

1. Yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*,
2. Dried egg-yolk,
3. Aleurone particles obtained from the flour, and
4. Powdered glass.

Yeast cells and yolk particles were used instead of bacteria, since they are a full nourishing food for the paramecia. Also the aleurone particles were satisfactorily used for feeding. Powdered glass has no nutritive value, but since it is chemically neutral, it may be recommended as an appropriate substance for investigating the suspension uptake in the paramecia, the more so that the animals do not discriminate glass particles from food particles, they readily ingest the powdered glass, and thereafter form very regular and clearly shaped food vacuoles.

Each kind of food materials was thoroughly mixed with the buffer solution of pH = 7.10. Care was taken to concentrate the mixture at an optimal level since the shape, the formation and the process of filling the food vacuole largely depends upon the number of particles in the medium (Dembowski 1922, Bozler 1924, Frisch 1937, Mast 1947).



The yeast cells are particularly suitable for investigating the food vacuole formation. In some instances, the first vacuole filled with this kind of food considerably differs from the subsequently formed vacuoles both in the diameter and in the number of ingested particles. Occasionally, the number of yeast cells ingested in the first vacuole is 5 to 7 times larger than that of the next vacuoles (Brutkowska unpubl.). In essence, this holds true for the aleurone and egg-yolk particles as well.

#### Preparation of food suspensions

1. Yeast and egg-yolk suspensions: 5 mg yeast or egg-yolk were mixed with 5 ml of buffer solution in a porcelain mortar, stirred for 2 min., and thereafter put into a flask. Ten minutes later, the supernatant (approximately 3 ml) was decanted, and offered to the animals.

There were about 1 to 1.5 millions of yeast cells in 1 ml of the suspension. The yolk suspension was not uniform with regard to the size of the particles, and thence it was not possible to define its concentration.

2. Aleurone suspension: The aleurone particles were obtained by 2 min. centrifuging 1 g flour together with 10 ml buffer solution at a speed of 1500 to 2000 r.p.m. The concentration of the aleurone suspension was nearly the same as that of the yeast suspension, and contained particles of approximately the same size.

3. Glass suspension: Glass particles, which had been obtained from grinding the pieces of the Jena glass in a ball-mill, were put through a piece of bolting cloth, and thereafter centrifuged similarly to the flour. The glass suspension contained particles of 0.5 to 1.0 microns in diameter; they displayed Brownian movements and did not fall down to bottom even during several days.

#### Details of the experimental procedure.

Samples of the *Paramecium* suspension were thoroughly mixed with samples of the food suspensions of a required pH value in proportion 1:1, and pH of the mixtures were determined with the potentiometer. The animals were permitted to take food for 3 or 10 minutes. Thereafter the food ingestion, was stopped by transferring the paramecia to buffer solution of pH = 7.10.

In an attempt to define the number and diameter of food vacuoles the photomicrography technique was used. A few drops of the solution containing paramecia were transferred to a large slide with a micropipette, and placed under the low-power dissecting microscope. Subsequently, pictures were taken using the exposure time 0.01 or 0.04 sec. Measurements were made on 100 successive specimens, except for those whose appearance was not clear enough, or cellular division was in progress.

## Results

Plate I 1 shows that following 2 hour starvation in the buffer solution of pH = 7.10 the first vacuole, which had been formed after placing the animals in one of the food suspensions except that containing the glass particles, is noticeably larger than the subsequently formed vacuoles. The vacuoles formed in the glass-powder fed animals displayed no differences in their size (Pl. I 2).

Fig. 1 illustrates the effect of pH on the diameter of the first vacuole. It also indicates that the diameter depends on the diet. It has been found that the largest one is that of the vacuole filled with yeast cells (51.0 microns), while following ingestion of the egg-yolk or aleurone particles the vacuole diameters

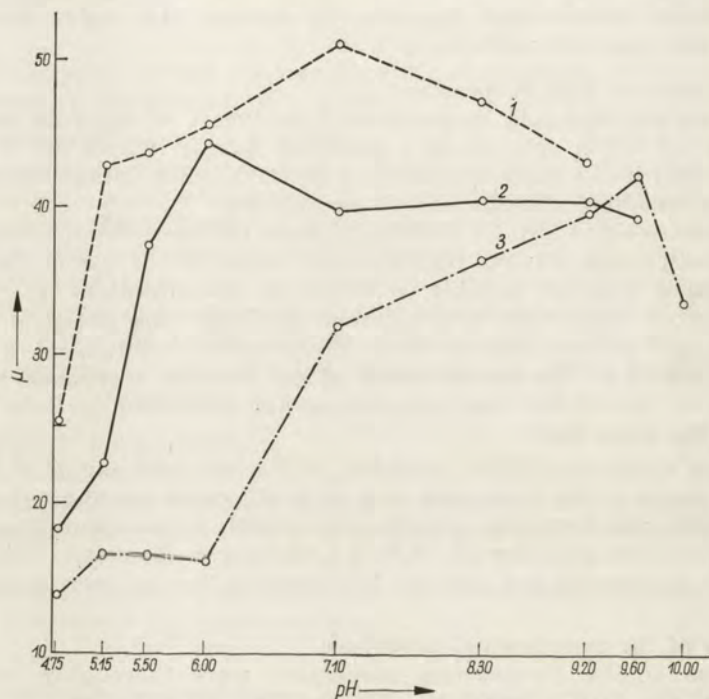


Fig. 1. Average diameter of the first food vacuole of *P. caudatum* at different pH values

Abscissa: pH, ordinate: the dimensions of the diameter of the first food vacuole in microns. 1. — yeast cells diet; 2. — egg-yolk diet; 3. — aleurone diet. Note that the diameter of the first food vacuole considerably increases at pH 5.15 to 6.0.

are 40.0 and 32.0 microns respectively. These proportions are maintained within wide pH ranges except for pH = 9.60 at which the average diameter of the aleurone vacuole exceeds that after ingestion of the yolk.

Fig. 1 further shows that the diameter of the first food vacuole is very small at pH = 4.75. Under these conditions, changes of more general aspects of the behaviour of the paramecia are also noticed. First, immediately after placing the animals into such environment the ciliary reversal occurs which is associated with the acceleration of locomotion and avoiding reaction. A few seconds later, most of the animals aggregate in a ring near the margin of the drop leaving its middle portion almost free. Their food vacuoles very often contain only few food particles, and they are smaller than at any other pH range. It must be emphasized, however, that the food vacuole formation per se is not inhibited.

At pH = 5.15 animals' behaviour gets closer to the normal state: the ciliary reversal disappears, and the paramecia are uniformly distributed throughout the medium with no signs of aggregating at any special points. As seen in Fig. 1 the diameter of the first vacuole markedly increases, and the increment is particularly evident after ingestion of yeast cells.

In definite alkaline pH ranges the behaviour of the paramecia resembles that of the strong acid solutions: the forward movement becomes more rapid, and it occurs in association with ciliary reversal and aggregation of most of the animals near the edge of the drop. The diameter of the first vacuole decreases, yet it is superior to that noticed for the extreme acid pH ranges.

It is interesting to note that the maximum points of the curves standing for the diameter of the first food vacuole in different food suspensions correspond with different pH ranges. Thus, the maximal diameter of the yeast vacuole is attained at pH = 7.10, while that for yolk and aleurone particles is at pH = 6.00 and 9.60 respectively.

Another interesting finding refers to the destructive action of various pH ranges upon the paramecia situated in different food suspensions. Thus, while being fed with the yeast cells 50 per cent of the animals die within 5 minutes at pH = 9.60. However, before the death they form a food vacuole of considerable size. Similarly, in the presence of yolk particles a high mortality is caused at pH = 10.00. On the other hand, if the two mentioned food suspensions are replaced by the diet of aleurone, the animals show no symptoms of depression throughout the period of many hours at pH = 10.00, while at pH = 9.60, at which (as described above) the first vacuole of maximal diameter is formed, no distinguishable difference appears as compared with the normal behaviour.

This evidence clearly indicates that a very definite interaction must exist between the food suspension and the experimental medium. For further analysis of this problem a series of experiments was designed as a direct test of the effect of pH upon the rate of the food vacuole formation under conditions of different diets. For this purpose the number of the food vacuoles was determined within 3 (Fig. 2 A) and 10 (Fig. 2 B) minutes after placing the animals into one of four food suspensions at varying pH. In addition to the yeast, egg-yolk and aleurone diets, the glass suspension was employed in a hope that, in the presence of chemically neutral particles, the effect of the H ion concentration upon food vacuole formation will be revealed more clearly than in the case of nutritive materials. It also was expected that this might allow the formulation of some definite view upon formation of the first food vacuole.

Fig. 2 A shows that during 3 min. period of observation there are formed only a few food vacuoles under conditions of a digestible substance: the maximal number for yeast and aleurone is close to 2 at pH = 5.15, whereas that for yolk suspension slightly exceeds 2 at pH = 4.40. In the neutral range of pH the number of yeast and yolk vacuoles drops to 1, while one aleurone vacuole is formed at the alkaline range of pH. Briefly, observations conducted within 3 min. indicate that, regardless of the kind of the digestible substance, the H ion concentration appears to influence the food ingestion uniformly.

Conversely, as seen in Fig. 2 B, the number of food vacuoles within 10 minutes is clearly dependent on the diet.

Fig. 2 further shows that the food vacuole formation in animals fed on glass-particles principally differs from that observed in the suspensions containing a digestible substance. The difference seems to be due to the fact that, if glass particles are available, all food vacuoles, including the first one, are of the same size. The most striking finding, which results from these experiments is that indicating a shift of optimum for the food vacuole for-

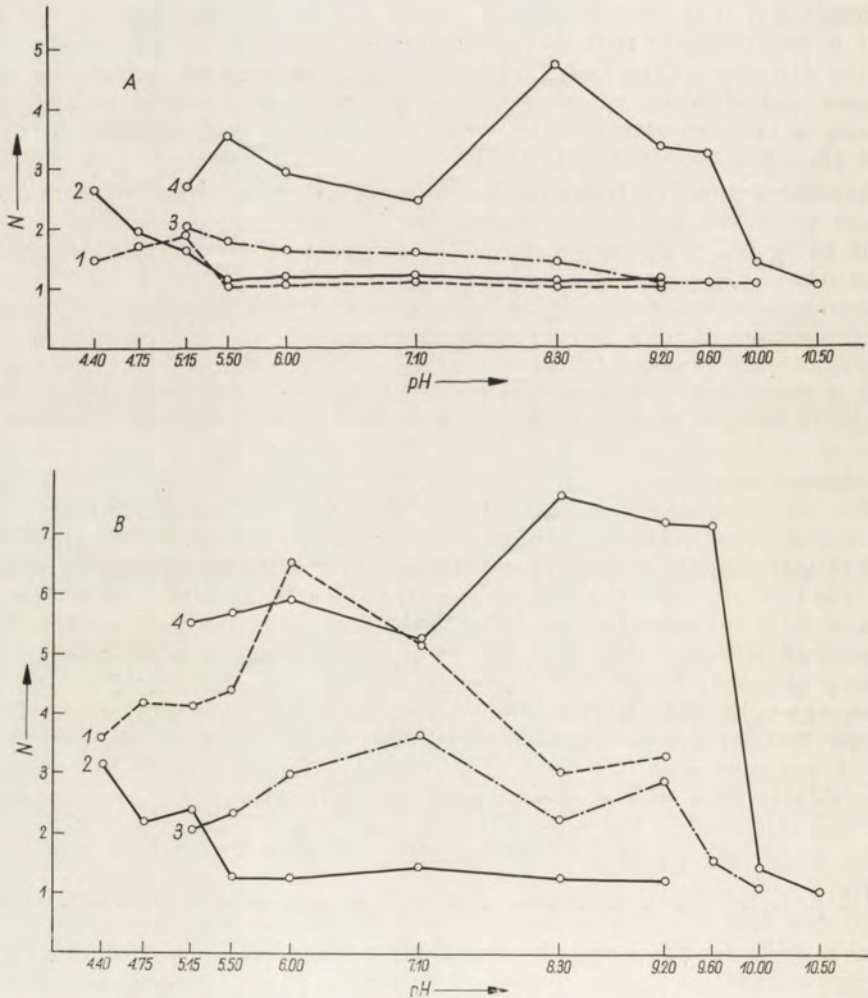


Fig. 2. Mean number of food vacuoles ingested at different pH values within 3 min. (A) and 10 min. (B)

Each point represents the mean number of food vacuoles obtained in 100 animals. Abscissa: pH, ordinate: number of food vacuoles (N). 1. — yeast cells diet; 2. — egg-yolk diet; 3. — aleurone diet; 4. — glass diet.

mation in the glass suspension towards the alkaline range. On the other hand, the acid range appears highly destructive for the paramecia. Below  $\text{pH} = 5.15$  testing the animals is not possible because the survival time is too short to make measurements. However,  $\text{pH} = 5.15$  corresponds to the onset of the formation of glass vacuoles as well, and once the process has started, it goes up at a very rapid rate,  $\text{pH} = 5.50$  to  $6.00$  being the optimum range.  $\text{pH} = 8.30$  may be considered the second optimum point for the rate of glass vacuole formation. It is also the maximum point, since it is superior to the optimum points on the acid side.

### Discussion

The results of these experiments show that, under conditions of a digestible substance diet, the effect of  $\text{pH}$  on food vacuole formation in *Paramecium* is clearly reflected in the diameter of the first vacuole. Thus, it has been demonstrated that, in the experimental medium containing yeast cells the maximal diameter of the first vacuole is attained at  $\text{pH} = 7.10$ , while that in the presence of egg-yolk or aleurone particles is at  $\text{pH} = 6.00$  and  $\text{pH} = 9.60$  respectively. Regardless of the type of the diet, the smallest diameter of the first vacuole is at  $\text{pH} = 4.75$ . Thereafter, the diameter tends to increase with alkalinity, but this increment appears to be limited and followed by an abrupt decline in the alkaline side.

Lee 1942 reports that  $\text{H}^+$  ion concentration has no effect on the diameter of food vacuoles. However, his observation was made with the Indian ink which, like glass particles used in the present study, produces no differentiation of food vacuoles. Metalnikow 1912 and Mast 1947 point out that a huge food vacuole is formed after transferring the paramecia from a solution which is poor to one which is rich in digestible substance, but they fail to give conclusive proportions concerning the mechanisms which would account for this result.

Our findings indicate that in the presence of a digestible substance at least 3 minutes are necessary for the formation of the first vacuole. This accounts for the difference in the rate of food vacuole formation as calculated for 3 and 10 minutes. This also gives ground for the argument that following 3 minutes the rate of food vacuole formation as an index of the effect of  $\text{pH}$  on the ingestion of food particles is dependent on the kind of the diet. Inspection of the curves in Figs. 2 and 3 indicates that when an indigestible substance, like glass particles, is employed as food material, the food vacuole formation rate is an adequate method irrespective of the time of observation. Under these circumstances, all food vacuoles, including the first one, are of the same size and each of them requires approximately the same period of time for its formation.

In general, our results regarding the glass-particles vacuole formation confirm Lee's 1942 findings except for the optimum point at the alkaline  $\text{pH}$  range obtained in the present study. It is likely that this difference may have been caused by addition of sodium borate in our experiments. This suggestion agrees with the observation of other workers (Mills 1931, Mast and Fennel 1938) indicating that a two-peak curve is obtained, if certain inorganic salts are added to the experimental medium.

In addition to the findings concerning the effect of pH on the food vacuole formation, the data of these experiments provide evidence on the intimacy of interaction between the medium and the food substance, as well as on some specific aspects of the destructive action of pH. As seen in Fig. 1 the curves representing the formation of the first food vacuole are sharply cut off on the alkaline side of neutrality. This is because of the death of the animals which appears so suddenly that no measurements can be made before, although it was noticed that ingestion of food was continued to the final moment prior to the death. These results seem to have no relation to the observations made by Grębecki and Kuźnicki 1956 with regard to the toxicity of pH which has been defined in terms of the percentage of mortality within 24 hours. Under our conditions, the pH were considered to be toxic, if they caused a mortality of at least 50 per cent of specimens during less than 10 minutes. Accordingly, the experimental medium of pH = 9.60, containing yeast cells, was considered toxic because a half of the animal culture died within a few minutes. On the other hand, in the presence of the diets of aleurone or glass particles the same pH value produced no damage to the paramecia, and, therefore, under these circumstances, it was not regarded as toxic.

The mechanisms concerning the effect of pH on the food vacuole formation are not easily to explain. Mills 1931 maintains that "changes in the rate of ciliary movements are largely responsible for changes in the rates of food ingestion", since "the effect of changes in the pH of medium on the rate of movement of *Colpidium* was found to correspond very closely to the effect of similar pH on the rate of food ingestion". The author also concludes that the rate of food vacuole formation is limited by an increase in the viscosity of the medium due to the mucus produced by the animals in sub-lethal concentrations. Subsequently, Lee 1942 came to the similar conclusion in his investigation on *Paramecium* by indicating a close correlation between the optimum pH value for the food vacuole formation and the optimum range of pH for the growth of the animal culture.

Among the considerations which arise as we analyze the results of the present experiment as well as those obtained by other workers in this laboratory is the finding referring to the range 5.15 to 6.00. The above data indicate that the food ingestion of *Paramecium* is favourably affected under these conditions. Dembowski 1929 reports that the optimum point of the negative geotaxis of *Paramecium* is at pH=5.1. Recently, Dryl 1959a and 1961 has demonstrated that pH=5.15 to 6.28 is the optimum H ion concentration area for the forward movement and chemotaxis, while Grębecki 1962a has provided an experimental evidence showing that pH=5.18 to 5.70 causes the initiation of the ingestion of cation dyes. Since these effects are found to be close to the pH=5.25 which is the isoelectric point of the body surface of *Paramecium* (Grębecki 1962b), it seems probable that they are associated with the decrease of viscosity of cytoplasm, or may indicate that the intake of suspended particles depends on the electrochemical properties of the surfaces. The second explanation supports Adams' 1962 observations indicating that the phagocytosis in *Monas* is related to the surface potential of the organisms ingested.

## Summary

It has been found that pH exerts a definite influence on the food vacuole formation in *Paramecium caudatum*. Under conditions of food substance diets, containing yeast cells, egg-yolk or aleurone particles, the effect of pH is clearly reflected in the diameter of the first vacuole. In the presence of the digestible substance the food vacuole formation rate is uniform within 3 minutes, and may be an index of the effect of pH on food ingestion during this period. After 3 minutes the rate of food vacuole formation as an index of the effect of pH on the food ingestion is correlated with the kind of the diet. Conversely, in the presence of glass particles the rate of food vacuole formation is the index of the effect of pH on the food ingestion irrespective of the time.

The effect of pH on the food vacuole formation seems to be intimately correlated with the isoelectric point which appears to determine many of the basic functions of *Paramecium caudatum*.

## STRESZCZENIE

pH wywiera niewątpliwy wpływ na tworzenie wodniczków pokarmowych u *Paramecium caudatum*. W obecności takich substancji pokarmowych, jak komórki drożdży, cząstki żółtka jaja kurzego lub aleuronu, pH wywołuje zmiany średnicy pierwszego wodniczka pokarmowego. Częstość tworzenia wodniczków pokarmowych z substancji jadalnych jest jednolita w czasie 3 minut od umieszczenia pantofelków w badanym środowisku i może być uważana w tym czasie za wskaźnik działania pH na pobieranie pokarmu niezależnie od rodzaju diety. Po upływie 3 minut częstość tworzenia wodniczków pokarmowych pod wpływem pH jest charakterystyczna dla rodzaju pobieranej substancji pokarmowej. W obecności cząstek szkła częstość tworzenia wodniczków pokarmowych jest wskaźnikiem działania pH na pobieranie pokarmu niezależnie od czasu.

Wpływ pH na tworzenie wodniczków pokarmowych jest ściśle skorelowany z punktem izoelektrycznym pelikuli.

## REFERENCES

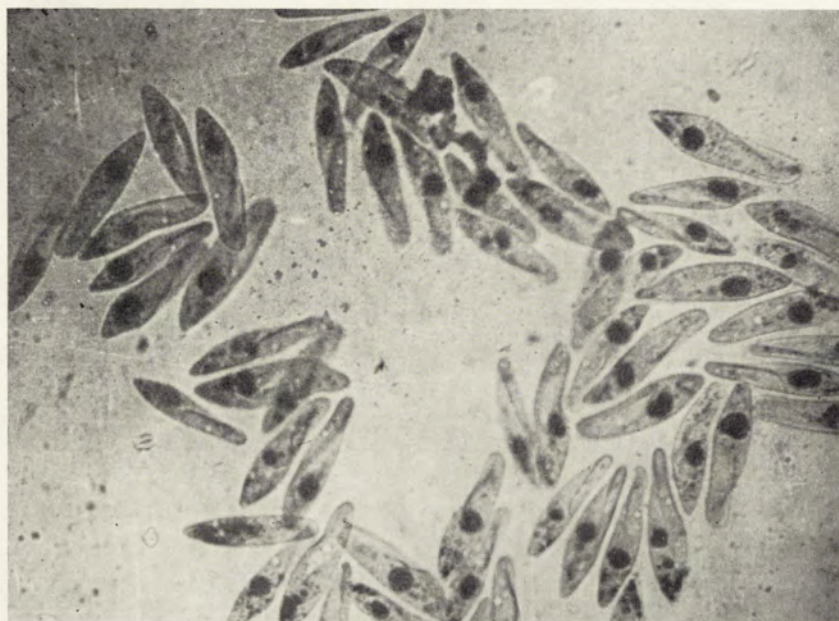
- Adams M. N. E. 1962: Some studies on phagocytosis of *Pseudomonas oleovorans* by a euryhaline species of *Monas*. Proceedings of the 1st International Conference on Protozoology, Prague, Czechoslovakia (in press).
- Bozler E. 1924: Ueber Morphologie der Ernährungsorganellen und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum* Ehrb. Arch. Protistenk. 49, 163—215.
- Dembowski J. 1922: Ueber den Einfluss der Suspensionskonzentration auf die Anzahl der gebildeten Nahrungsvakuolen bei *Paramecium caudatum*. Trav. Lab. biol. Nencki Varsovie 1, 1—16.
- Dembowski J. 1929: Vertikalbewegungen von *Paramecium caudatum*. II. Einfluss einiger Aussenbedingungen. Acta Biol. Exp. 3, 195—239.
- Dogiel V. und Issakowa-Keo M. 1927: Physiologische Studien an Infusorien. II. Der Einfluss der Salzlösungen auf die Ernährung von *Paramecium*. Biol. Zentralbl. 47, 577—586.

- Dryl S. 1959a: Effects of adaptation to environment on chemotaxis of *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Exp. 19, 83—93.
- Dryl S. 1959b: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. J. Protozool. 6 (Suppl.) Abstr. 96.
- Dryl S. 1961: The velocity of forward movement of *Paramecium* in relation to pH of medium. Bull. Acad. pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Frisch J. A. 1937: The rate of pulsation and the function of the contractile vacuole in *Paramecium multimicronucleatum*. Arch. Protistenk. 90, 123—161.
- Grębecki A. 1962a: Electrobiologie d'ingestion des colorants par *Paramecium caudatum*. Protoplasma 56, 89—98.
- Grębecki A. 1962b: Point isoélectrique superficiel et quelques réactions locomotrices chez *Paramecium caudatum*. Protoplasma 56, 80—88.
- Grębecki A. and Kuźnicki L. 1956: Autoprotection in *Paramecium caudatum* by influencing the chemical properties of its medium. Acta Biol. Exp. 17, 71—107.
- Lee J. W. 1942: The effect of pH on food vacuole formation in *Paramecium*. Physiol. Zoöl. 15, 459—465.
- Mast S. O. 1947: The food vacuole in *Paramecium*. Biol. Bull. 92, 31—72.
- Mast S. O. and Fennel R. A. 1938: The relation between temperature, salts, hydrogen ion concentration, and frequency of ingestion of food by *Amoeba*. Physiol. Zoöl. 11, 1—18.
- Metelnyk S. 1912: Contribution à l'étude de la digestion intracellulaire chez les protozoaires. Arch. zool. exp. et gén. 10, 373—497.
- Mills S. M. 1931: The effect of the H-ion concentration on *Protozoa*, as demonstrated by the rate of food vacuole formation in *Colpidium*. J. Exp. Biol. 8, 17—29.
- Sonneborn T. M. 1950: Method in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool. 113, 87—147.

#### EXPLANATION OF THE PLATE I

Food vacuoles in *Paramecium caudatum* after ingestion of egg-yolk (1) and glass particles (2) during 3 min. stay in the experimental medium. Note that the first food vacuole filled with the yolk is considerably larger than that formed of the glass particles





1



2

M. Brutkowska

auctor phot.



Department of Protozoology of the Institute of Parasitology,  
Czechoslovak Academy of Sciences, Praha 2, Viničná 7

Jiří LOM and Jiří VÁVRA

## The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores

Způsob vystřelování sporoplasmu u spor mikrosporidií

The mode of sporoplasm extrusion has been for a long time a matter of confusion among protozoologists. This was due to the very small dimensions of the spores, insufficient knowledge of their morphology and high speed of filament extrusion, so that instead of concrete data, the interpretation of the hatching of spores was in many cases based on speculations.

Most probably Thélohan 1892 was the first to observe the polar filament in *Microsporidia*; he also succeeded to induce artificially its extrusion. Since then many contradictory opinions have appeared in the literature. Stempell 1909 explained the polar filament as an evagination of a hollow tube, through which the sporoplasm flows out. His view was endorsed by Strickland 1913. Korke 1916 observed refractive droplets on the distal end of the extruded filament and correctly explained this structure to be the germ. Therefore he assumed that the filament helps the germ to reach distant areas of tissue, but he was not sure about the way of its accomplishment. A further feature of the filament was recorded by Ishivata 1917 who found it to be sticky. Since Korke's observations many authors found refractive droplets at the end of extruded filaments of spores of different species, though they did not always agree with the explanation of this phenomenon. This was the case with Morgenthaler 1922 who also observed the filament to evert on extruding in *Nosema apis*; also Kudo 1925 took this droplet to be a substance poured out from the crashed filament, and almost all subsequent authors report similar observations. E.g. Zwölfer 1926 took the filament for a hollow tube everting during extrusion with a glutinous surface which helps the spore to adhere to the surface. He could not confirm Trappmann's 1923 findings concerning the creeping out of the sporoplasm through the hole left by the detached filament. Zwölfer succeeded in digesting the liberated filament with trypsin; thus he proved that the filament could not be an invaginated projection of the chitinous spore shell, as Stempell 1909 assumed.

The two relevant observations of Ohshima 1927, 1937, presented a great step forward. In his method he employed a mixture of hydrogen peroxide with NaCl for the polar filament extrusion. He was the first to reveal the relation between osmotic pressure and extrusion: with growing

concentration (up to 15%) of the saline the osmotic pressure increased and the extrusion of the filament was slowed down to a zig-zag motion. In high concentrations some of the spores failed to extrude completely, the filaments remained thick as if containing some substance. Basing on his experiments, he came to the conclusion (1937) that the sporoplasm passes from the spore case through the hollow evaginated filament. Even some of the most recent authors follow the early Ohshima's concept of the sporoplasm extrusion through the hollow filament, e.g. Gibbs 1953, 1956, Bailey 1955, Walters 1958, West 1960, and with some reservations also Kramer 1960. Weiser 1947, 1958, 1959 also discussed extensively this problem and stressed the obstacles (narrow and long lumen of the filament) which the sporoplasm has to overcome passing through the filament.

There were, however, numerous differing opinions, such as Connet's 1932 who found in the spores of *Plistophora chironomi* a small lid or cap which could be drawn off leaving the way open for the germ. A similar view was expressed by Hall 1952 and Günther 1960 who presumed the germ to leave the spore through the hole in the apex. Kudo 1918 basing on the fact, that  $H_2O_2$  is the most effective chemical stimulus, suggested that the spore might contain a peroxidase which by liberating gaseous oxygen develops a sudden pressure resulting in the explosive discharge of the thread.

A most peculiar explanation of the spore hatching has recently been given by Dissanaiké and Canning 1957. According to them the coiled polar filament is whipped out from the spore on the given stimulus in a jack-in-the-box manner carrying the sporoplasm attached to its distal end. Their finding were supported by Krieg 1955 who reported that the filament is a solid structure and not a hollow tube. Two years later Laird 1959 joined their view on interpreting his observation on *Plistophora colessii*.

It is obvious from all these briefly mentioned data that no agreement has been achieved in the interpretation of such an interesting biological process, although the theory of an everting hollow filament was most convenient.

What the authors consider to be conclusive evidence confirming the last theory is presented in this paper.

#### Material and methods

Spores of *Plistophora hyphessobryconis* Schäperclaus, a parasite common in several species of aquarium fishes, proved very suitable for our experiments with the extrusion, not only because of their relatively big dimensions ( $4 \times 6.5 \mu$  in the average) but also owing to the fact that the extrusion is easily induced by employing hydrogen peroxide solution. Attempts were made to use also other microsporidia from fresh-water crustaceans and from some insects; in spite of numerous reports on  $H_2O_2$  induced extrusions only *P. hyphessobryconis* proved to give regular results. The final concentration of  $H_2O_2$  was 5%; the spores extruded within two minutes after the reagent was added. Fresh spores, just removed from fishes, gave satisfactory and comparable extrusion; in spores stored for some time in the refrigerator, the extrusion is limited to a part of spores only, and requires longer time of treatment, though they remain without any morphological changes for more than a year.

In order to observe the movement of polar filament, the spores were mixed with egg white (equal parts) and  $H_2O_2$  (final concentration 5%) and covered with a cover slip. Hydrogen peroxide coming in contact with the egg-white, develops bubbles under the cover slip. The motion of extruding filaments, passing through those layers is considerably retarded; moreover the differences in refractivity index make the filament appear very distinctly.

This "bubble technique" enables to observe the way of the motion of filaments and the ejection of droplets from them, but the whipping of the filament out of the spore case is too rapid to be studied. We have therefore developed a technique in which we succeeded to considerably slow down the process by increasing the osmotic pressure. To prevent the "reactive" motion of the spore during extrusion we have also increased the viscosity of the environments by means of gelatine. We have mixed a drop of spore suspension with equal parts of a saccharose solution (10 g in 10 ml of distilled water) and of almost "saturated" gelatine solution warmed just to remain liquid; we quickly mixed all components, added 10%  $H_2O_2$  and covered the preparation with a cover glass. The gelatine immediately solidified and thus the extruding spores were firmly fixed. By means of this technique and using phase-contrast microscopy we could observe all phases of extrusion and also record it in a movie. Phase contrast microscope proved to be inappreciable in observing changes in the spore, otherwise undetectable.

### Observations

1. Normal spores are egg-shaped (Pl. I 1),  $6.5\mu$  in size with a great vacuole in the wider posterior end; the walls of this vacuole bear ribs, indicating the situation of the coiled polar filament. In stained spores, another "vacuole" can be observed in the narrower anterior end, this being the swelling structure called "polaroplast". The sporoplasm itself, containing one nucleus, forms a narrow bridge between these two vacuoles. On the apex of the spore a MacMannus positive cap is present. In phase-contrast microscope the whole spore content is highly refractive, in contrast to the posterior vacuole. Within this vacuole, a little amorphous body can be seen, moving by Brownian movement.

2. Activated spore. In the concentration of  $HO_2O_2$  used in the gelatine technique, the spores did not show any changes within the first few minutes. After this time a faint darkening of the anterior end of the spore appeared, slowly becoming more and more intense, the limits of the darkened area being clearly differentiated. Finally, a distinct dark "vacuole" can be seen in the anterior end of the spore. This vacuole is irregularly obliquely elongated towards the wall of the posterior vacuole. If the spores are treated with a too high  $H_2O_2$  concentration, the process is stopped in this stage. However, under conditions of our method, this structure requires only a short time (20 sec.) to be ripe, and then it penetrates into the posterior vacuole. Instantaneously the extrusion of the polar filament proper follow; the thick and short part of the filament protrudes out of the anterior pole, at first very slowly so that it gives the impression of the process being stopped for a moment (up to 12 sec.). Then the whole of the polar filament bursts out; it evaginates out of the spore shell turning inside out. At this very moment the originally coiled filament

quickly unwinds from the threads spiralled along the spore walls. The walls of posterior vacuole disappear at this stage and the loops of the unreeling filament freely move in its space. Along with this unwinding of the filament a clear zone appears in the hinder half of the spore, proceeding towards the middle of the spore. Before all threads of the filament are everted, the content of the spore is driven into the filament and together with the sporoplasm which forms — before being sucked up into the filament — a dark crescent in the anterior end. Our "gelatin technique" enables a clear observation of filaments penetrating easily through the solidified gelatine. The first narrow filament remarkably widens as the sporoplasm passes it. Having passed through the whole length of the filament, the sporoplasm is ejected out of its tip to form a light breaking droplet. It contains the sporoplasm surrounded by intrasporal fluid, which evidently causes the high refractivity of the blister. Some two minutes later, the droplet bursts and releases a small, uninucleated, irregularly shaped amoebula. After the sporoplasm has been ejected, the filaments shrink into a thin thread.

This shrinkage can be easily observed if the spores are brought to extrusion in a more  $H_2O_2$  solution; some moment after the extrusion, the empty spore case moves forward, being pulled by the shrinking filament, because its proximal end is still firmly connected with the empty shell. This connection is semipermeable as the shell is compressed in the environment of high osmotic pressure.

While extruding, the polar filament is of rigid structure, capable of penetrating into medium of high viscosity (solidified gelatin) or float freely into air, as can be observed at the border of some preparations. The extrusion is not complete in such areas, the filament moving very slowly in free air without any support.

When fed to the ciliate *Paramecium caudatum*, the spores extrude in high percentage. The filaments pierce the cytoplasm and pellicle, projecting freely from the cell.

In all experiments with the activation described above, we could always observe some spores in which a complete extrusion had not been attained; their filaments are remarkably thick and of tubular appearance as clearly demonstrated in Plate II 5. In Robinow stained preparations of such filaments the nuclear substance is enclosed inside the filament drawn out to considerable length.

#### Discussion

Various reagents have been used by foregoing authors to induce extrusion in microsporidian spores (iodine, hydrochloric acid, nitric acid, acetic acid salite, etc.). The reports of most authors, however, favour  $H_2O_2$  to produce extrusion. In liquid water environment we can observe only the superficial picture of extrusion; any more precise study of the process within the spore itself is prevented by the motion of the filament, causing the spore to shake vigorously. The greatest advantage of our technique is the immobilisation of the spore during the experiments and the use of phase-contrast microscopy. The „bubble technique" described above is an improved step of simple techniques of West 1960 and Kramer 1960.

Thus we could corroborate the results achieved by the two latter authors and obtain further important facts, which together with the results of electron microscopical studies on microsporidian spores (L o m and V á v r a 1961, 1962) enables us to present an unique explanation of the hatching process in microsporidian spores and the role played by individual structures of the spore.

The  $H_2O_2$  obviously affects the apex structure, known as the polar cap (V á v r a 1959, H u g e r 1960) which occurs in all microsporidian spores and thus enables the water to get into the spore. Since other chemicals as well as dessication and pressure are capable to produce extrusion in similar microsporidians, we assume that these unspecific influences can substitute the specific stimuli probably existing within the alimentary tract of the host (we could not induce hatching by peptic, tryptic, or papain digestion); all these, however, have the same effect and cause the extrusion.

The structure known as "anterior vacuole" in microsporidians is no real vacuole, but a formation capable to swell up enormously when contacting water, and is identical with the so-called polaroplast (H u g e r 1960, L o m i V á v r a 1961) discovered in electron microscopy. The swelling of polaroplast causes it to increase in volume and proceede to the posterior vacuole. At this moment the intrasporal pressure probably reaches the level sufficient for the filament to begin its eversion. The filament everts like a finger of a glove, being propelled by the fluid driven out of the spore by intrasporal pressure. This eversion and the high intrasporal pressure only are capable to give the filament its rigidity and energy on penetrating the environment and, in natural conditions, the tissue of the host. Further proof of their penetrating ability is the fact that in some microsporidian species the filaments pierce through the pansporoblastic membrane if artificially extruded. In *Cestoda* infecting species (e.g., *Nosema helminthorum*) the filament must penetrate a remarkably thick cuticule as we can hardly imagine any other way of infection.

W e s t 1960 affirmed that the contraction of the filament is essential for the ejection of the sporoplasm. According to our own observations the elasticity of the filament plays an important role not only during the eversion of the filament but principally during the passage of sporoplasm when it can be widened considerably. After the whole process of extrusion has been completed, the contraction of the filament is only a passive action because the stretching force has ceased to act. In agreement with W e s t, however, we could observe the end of the filament with the blister to stick to the glass surface. The following contraction of the filament causes the spore to be pushed forward.

We had also the possibility to compare the extrusion of *Plistophora* spores with pressure induced extrusion in spores of a *Bacillidium* species from *Limnodrilus* (to be described in a separate paper). The spores reach considerable dimensions so that all details of the spore are easy to be observed. In resting spores, the filament is represented by an analogous formation, the manubrium, which extends from the anterior pole of the spore backwards about one half of its length and then suddenly tapers to a short, thin filament. By means of a moderate pressure, this manubrium-filament complex extrudes in such a way that it is clear that the only manner in which this can be accomplished is the eversion (compare Pl. I 3 and 4). This proves the manubrium to be a hollow tube, too, and not a solid stick, as was assumed before. E.g. L é g e r et

Hesse 1916 observed such an extrusion in spores of *Mrazekia*-type, without having understood the real tubelike nature of the manubrium. Their observation has been overlooked by more recent authors, who all took the manubrium for a solid rod-like structure. In spores of other species of the family *Mrazekiidae* the application of pressure results in a mere pushing out of the manubrium without an eversion. This seemed to support their views. The extruded manubrium and filaments in spores of our species of *Bacillidium* reaches greater length than it had within the intact spore; it is evident that even the manubrium has a certain degree of elasticity.

Many details still remain obscure, but it is evident that the extrusion is a matter of swelling. By increasing the tonicity of the environment, the extrusion slows down and the amount of incompletely extruded spores increases. E.g. in *Plistophora hypheobryconis* spores the extrusion can be prevented by adding 50% glucose, the osmotic pressure of which is about 60 atm. This is in agreement with the observation of Ohshima who succeeded to retard the filament motion by using saline. In 25% NaCl the extrusion stops almost completely. In our experiments 25% of propylenglykol was the limit concentration. Ohshimas and our results indicate that the pressure within the swelling polaroplast is comparable with an osmotic pressure of 30–60 atm. Since we have not observed the spore case to possess any special elastic properties it is evident that the same pressure exists within the whole spore. According to our opinion this pressure is sufficient to overcome the resistance of the wall of everting filament, the friction between two surface within the everting filament, the friction of fluid within the filament and the resistance of the environment through which it penetrates.

The only possible place through which the intrasporal tension can be released is the apex, through which the filament everts. The assumed disposition of pressure within the spore is demonstrated in Fig. 1.

The only enigma in elaboration an extrusion hypothesis is the incompressibility of fluids: even under a pressure as high as 60 atmospheres a little enlargement of the volume of the spore, caused by everting of a part of the filament, could be sufficient to reduce the pressure to such extent that the whole process could be completely stopped. Therefore, some other factors are probably involved in the extrusion, e.g. hydraulic accumulation of energy within the spore based on enlargement of fluid density caused by increased intrasporal pressure. The most probable explanation, however, is that the posterior vacuole contains material capable of continuous swelling during the extrusion, thus accomplishing the full extrusion of the filament (Fig. 1D).

Thus, the eversion of polar filament in microsporidia is principally the same as in myxosporidian polar filaments and in nematocysts of *Coelenterata*. The similarity between myxosporidian polar capsules and nematocysts has been well known before. Here we would like to stress the analogies between coelenterates' nematocysts and microsporidian spores. E.g. out of the great amount of different types of nematocysts, the extruded filament of atrichous isorhiza of *Hydra littoralis* (terminology of Weill 1936, cited after Hyman 1940) looks exactly like the extruded filament of nosema-type spores; extruded microbasis mastigophore of anemones reminds of a *Bacillidium* spore with the filament complex consisting of a thick manubrium and a thin terminal filament (only in microbasis mastigophore the "manubrium" bears superfine



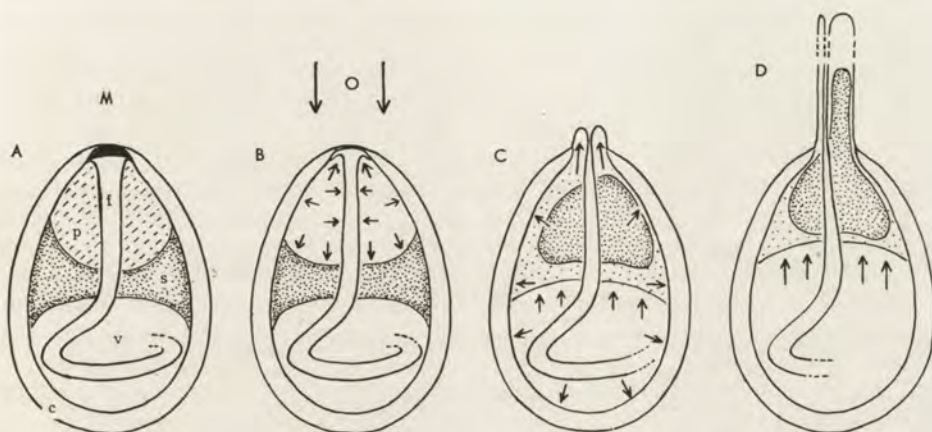


Fig. 1. Schematic representation of extrusion in a microsporidian spore

A. Scheme of an intact spore: C — spore case, F — polar filament schematically, with only one winding instead of many. Its anterior end is joined to the MacMannus positive cap M under the apex of the spore, where the spore case is extremely thin. This is the spot sensitive to outer stimuli. P — polaroplast, V — posterior vacuole, S — sporoplasm; B. Under the influence of outer stimuli O — the MacMannus positive cap in the spore has been destroyed and water contacts the polaroplast. The pressure of the swelling polaroplast acts upon the walls of the spore, upon the remaining spore content and also compresses the anterior part of the filament. C. The swelling polaroplast has achieved the limit pressure, necessary for extrusion. The swelled polaroplast has burst into the space of the posterior vacuole. The sporoplasm has been released from its normal position. In the hinder part of the spore appears a clear zone, which will proceed anteriorly as the spore content will be driven out through the filament. The pressure acts upon the whole spore case, but the only place which it can break through is the apex; the hollow filament begins to evert, its compressed inner part being turned inside out; D. The clear zone proceeds from the hinder end towards the apex, the sporoplasm is driven into the extruding filament

"ciliation"). Not only such morphological coincidences are striking, but also the fact, that the most accepted theory of nematocysts extrusion explains the whole action by swelling of a contained colloid. The nematocysts are normally impermeable to water, but most probably the stimulation received from the cnidocil — a response to the contact with prey etc. — acts by increasing suddenly the permeability of the capsular wall (Glaser and Sparrow 1909, Weill 1934, cited after Hyman 1940). Also under experimental conditions — which are in most cases much the same as in microsporidian spores — dilute acids or bases, pressure, heat etc. — the eversion takes place. Further, the stenoteles of *Hydra* are known to be capable of penetrating not only soft tissues of prey animals, but also their chitinous armor, and to discharge there their toxic content, and what is interesting, without any change of volume of the nematocyst (Weill). Thus the analogies between nematocysts and microsporidian spores are very close. Whether they have also a phyletic value that must be proved in future, whereby a meticulous investigation of the process itself and of the morphogenesis of their ultrastructure would be certainly of greatest value.

It is also worth of mention, that the toxicystes of some ciliates (Fauré-Fremiet 1959) also evert their tubular center when expanding.

### Summary

A survey of all existing views on filament and sporoplasm extrusion of microsporidian spores has been compared with results of observations of the authors achieved by means of special techniques.

It has been definitely confirmed that the sporoplasm can be injected into the host tissue through the hollow filament, which everts like a finger of glove on everting. The extruding is an osmotic action, for which the energy is supplied by a special organella, "polaroplast". After the polar cap is affected by digestive juice or chemicals, the polaroplast imbibes water and produces a pressure as high as 60 atmospheres within the spores. The extrusion begins at certain level of the pressure.

The authors discuss the possible physical base of this phenomenon and explain the function of some structure found in spores by means of electron microscopy.

### SHRNUTÍ

Všechny dosavadní názory na vystřelování polárního vlákna a sporoplasmu mikrosporidií jsou srovnávány s výsledky vlastních pozorování, dosažených pomocí zvláštních technik.

Bylo potvrzeno s konečnou platností, že sporoplasma může být vstříknuta dutým vláknem do tkáně hostitele. Vlákno se při vystřelování obrací jako prst rukavice. Vystřelování je osmotický děj, a energie k němu je dodávána zvláštní organelou, polaroplastem. Jakmile byla polární čepička narušena trávicí šťavou nebo chemikáliemi, polaroplast nasaje vodu a vyvine uvnitř spory tlak velký až 60 atmosfér. Až dosáhne tlak určité hodnoty, dojde k vystřelení.

Autoři diskutují možný fyzikální princip tohoto zjevu a vysvětlují funkci organel spory, popsaných při elektronově optických pozorováních.

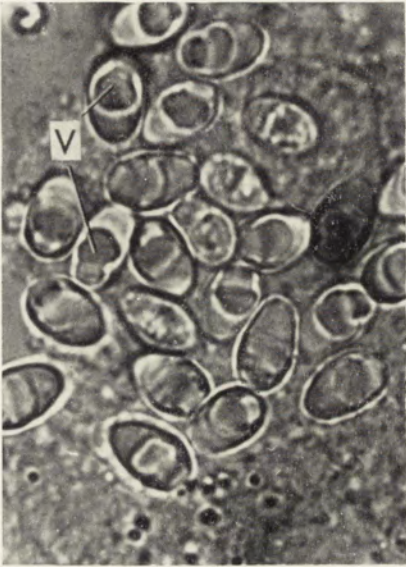
### REFERENCES

- Bailey L. 1955: The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* Zander. *Parasitology* 45, 86—94.
- Connet A. 1932: Le cycle évolutif du *Plistophora chironomi*. *La Cellule* 41, 181—202.
- Dissanaike A. S. and Canning E. U. 1957: The mode of emergence of the sporoplasm in *Microsporidia* and its relation to the structure of the spore. *Parasitology* 47, 92—99.
- Fauré-Fremiet E. 1959: Ultra-structure des Toxicystes chez les Ciliés *Rhabdophorina*. *J. Protozool.* (Suppl.) 6, 25.
- Gibbs A. J. 1953: *Gurleya* sp. (*Microsporidia*) found in the gut tissue of *Trachea secalis* (*Lepidoptera*). *Parasitology* 43, 143—147.
- Gibbs A. J. 1956: *Perezia* sp. (Fam. *Nosematidae*) parasitic in the fat body of *Conocephalum arenarium* (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *Parasitology* 46, 48—53.
- Günther S. 1960: Eine Microsporidie aus dem grünen Eichenwickler (*Tortrix viridana* L.). *Z. ang. Entomol.* 46, 209—212.
- Hall J. M. 1952: A new species of *Microsporidia* from the fawncolored lawn moth, *Crambus bonifatellus* (Hulst.). *J. Parasitol.* 38, 487—491.

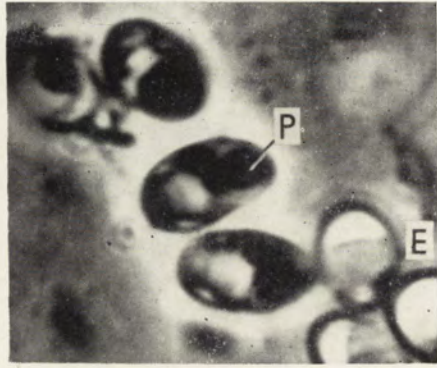
- Huger A. 1960: Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect Pathol.* 2, 84—105.
- Hyman L. H. 1940: The invertebrates: Protozoa through *Ctenophora*. Vol. 1. McGraw-Hill, New York.
- Ishiwata S. 1917: Note on a species of *Nosema* infecting *Attacus cynthia* Drudy. *J. Parasitol.* 3, 136—137.
- Korke V. T. 1916: On a *Nosema* (*Nosema pulicis* n. sp.) parasitic in the dog flea (*Ctenocephalus felis*). *Indian J. Med. Res.* 3, 725—730.
- Kramer J. P. 1960: Observations on the emergence of the microsporidian sporoplasm. *J. Insect Pathol.* 2, 433—439.
- Krieg A. 1955: Über Infektionskrankheiten bei Engerlingen von *Melolontha* spec. unter besonderer Berücksichtigung einer Mikrosporidien-Erkrankung. *Zbl. Bakt.*, 2 Abt. 108, 535—538.
- Kudo R. R. 1918: Experiments on the extrusion of polar filaments of Cnidosporidian spores. *J. Parasitol.* 4, 141—147.
- Kudo R. R. 1925: Studies on microsporidia parasitic in mosquitoes. V. Further observations upon *Stempellia* (*Thelohania*) *magna* Kudo, parasitic in *Culex pipiens* and *C. territans*. *Biol. Bull.* 48, 112.
- Laird M. 1959: Malayan protozoa I. *Plistophora collesi* n.sp. (*Sporozoa: Microsporidia*) an ovarian parasite of Singapore mosquitoes. *J. Protozool.* 6, 37—45.
- Léger L. et Hesse E. 1916: Sur la structure des spores des Microsporidies. *C. R. Soc. Biol.* 79, 1049—1053.
- Lom J. i Vávra J. 1961: Niektóre wyniki badań nad ultrastrukturą spor paszytła ryb *Plistophora hypessobryconis* (*Microsporidia*). *Wiadomości Parazytologiczne* 7, 828—832.
- Lom J. and Vávra J. 1962: Contribution to the knowledge of microsporidian spore I. Electron microscopic observation. *Protozoology — Transactions of the 1st International Conference on Protozoology, Praha 1961* (in press).
- Morgenthaler O. 1922: Der Polfaden von *Nosema apis* Zd. *Archiv f. Bienenkunde* 4, 53—60.
- Ohshima K. 1927: A preliminary note on the structure of the polar filament of *Nosema bombycis* and its functional significance. *Annot. Zool. Japan.* 11, 235—243.
- Ohshima K. 1937: On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. *Parasitology* 29, 220—224.
- Strickland E. H. 1913: Further observations on the parasites of *Simulium* larvae. *J. Morphol.* 24, 43—102.
- Stempell W. 1909: Über *Nosema bombycis* Nägeli nebst Bemerkungen über Mikrophotographie mit gewöhnlichem und ultravioletem Licht. *Arch. Protistenk.* 16, 231—358.
- Thélohan P. 1892: Observations sur les Myxosporidies et essai de classification de ces organismes. *Bull. Soc. Philom.* 4, 165—172.
- Trager W. 1937: The hatching of spores of *Nosema bombycis* N. and the partial development of the organism in the tissue culture. *J. Parasitol.* 23, 226—227.
- Trappmann W. 1923: Morphologie und Entwicklungsgeschichte von *Nosema apis* Zand. *Arb. Biol. Anst. Berlin* 11, 609—622.
- Vávra J. 1959: Beitrag zur Cytologie einiger Mikrosporidien. *Acta Soc. Zool. Bohemoslov.* 23, 347—349.
- Walters V. A. 1958: Structure, hatching and size variation of the spores in a species of *Nosema* (*Microsporidia*) found in *Hyalophora cecropis* (*Lepidoptera*). *Parasitology* 48, 113—120.
- Weiser J. 1947: Klíč k určování mikrosporidií. *Acta Soc. Sci. Nat. Moraviae* 18, 1—64.
- Weiser J. 1958: *Nosema laphygmae* n.sp. and the internal structure of microsporidian spore. *J. Insect Pathol.* 1, 52—59.
- Weiser J. 1959: Mikrosporidie. Monografická studie. Praha 1959, Dr. Sci. Dissert.
- West A. F. 1960: The biology of a species of *Nosema* (*Sporozoa: Microsporidia*) parasitic in the flour beetle *Tribolium confusum*. *J. Parasitol.* 46, 747—754.
- Zwölfer W. 1926: *Plistophora blochmani*, eine neue Microsporidie aus *Gammarus pulex*. *Arch. Protistenk.* 54, 261—340.

#### EXPLANATION OF PLATES I—II

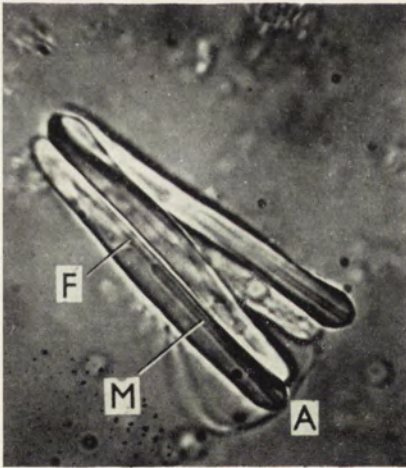
- 1: Normal, fresh spores of *Plistophora hyphessobryconis*, normal illumination, oil immersion. Note the great posterior vacuole with ribs on its walls (V)
- 2: Activated spores of *Plistophora hyphessobryconis*, phase contrast, a little more enlarged than the 1. P— the polaroplast, appearing dark ("anterior vacuole") and preparing for extrusion, and empty, spore cases (E)
- 3: Spores of *Bacillidium* sp. Normal illumination, oil immersion. Note the manubrium (M), continuing as a fine filament (F), and joined to the shell of the spore at its apex (A)
- 4: The same spores after pressure induced extrusion (not so enlarged as the 3), the manubrium and filament being everted after extrusion
- 5: Extruded filaments of *Plistophora hyphessobryconis*; oil immersion, phase contrast. Note the difference in thickness between filaments of completely extruded spores (C), and those extruded incompletely (IC), still containing the fluid
- 6: A great mass of spores of *Plistophora hyphessobryconis* (S) from which innumerable filaments have extruded; among the fine network of these filaments the ejected sporoplasms are visible. Phase contrast, obj. lens 10X.
- 7: Incompletely extruded polar filament of *Plistophora hyphessobryconis*, in which the elongated nucleus remained. Robinow stain, oil immersion lens
- 8: Ejected sporoplasms in the network of extruded filaments. Phase contrast, oil immersion lens



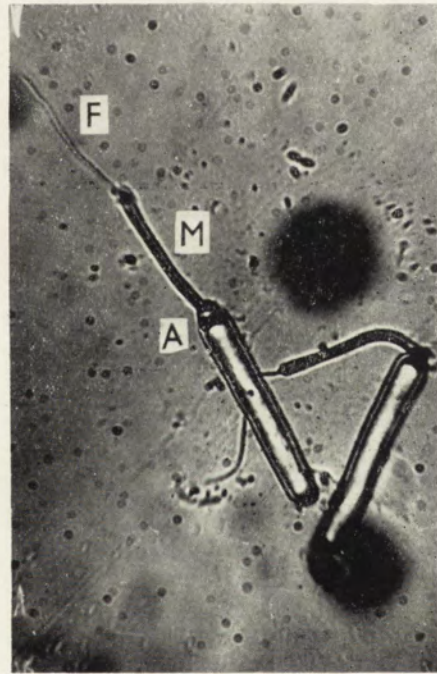
1



2



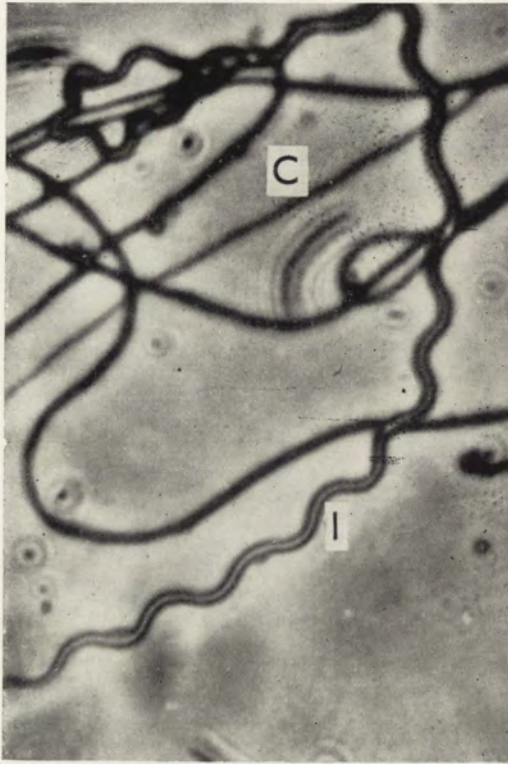
3



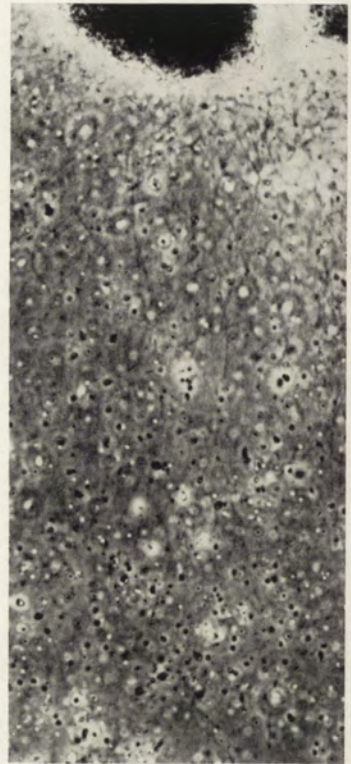
4

J. Lom et J. Vávra

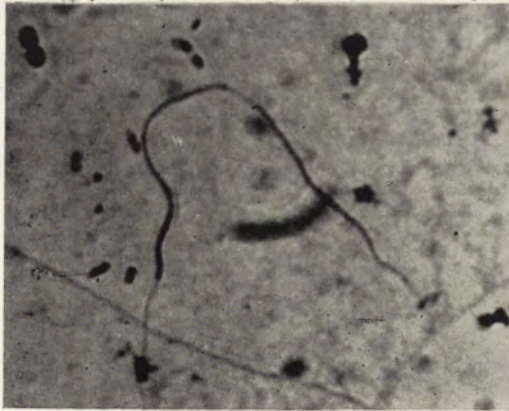
auctores phot.



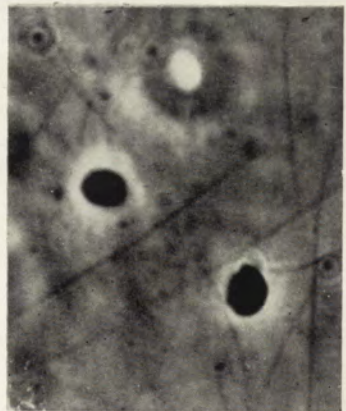
5



6



7



8

J. Lom et J. Vávra

auctores phot.

Laboratoire de Biologie générale de l'Institut M. Nencki de Biologie expérimentale,  
Académie Polonaise de Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Andrzej GRĘBECKI

## Galvanotaxie transversale et oblique chez les Ciliés

### Galwanotaksja poprzeczna i skośna u orzęsków

La bibliographie abondante de la galvanotaxie des Protistes munis des cils, accumulée depuis quelques dizaines d'années de recherches intenses, nous assure que ces organismes unicellulaires se meuvent sous l'influence d'un courant constant le long des lignes des forces du champ électrique, presque toujours vers la cathode<sup>1</sup>. Il semble que récemment nous nous rapprochons enfin à une explication correcte de ce comportement. Il reste quand-même quelques cas inquiétants de mouvements assez régulièrement orientés pour les appeler galvanotactiques, mais qui ne sont pas conformes à la direction des lignes des forces du champ. Le travail présent a pour but d'entamer une analyse de ces phénomènes.

#### *Spirostomum ambiguum* — Galvanotaxie transversale

Verworn 1896 a rapporté que *Spirostomum ambiguum*, après la fermeture du circuit, se contracte tout d'abord, reprend ensuite sa forme normale et enfin se place en travers du champ électrique. Le Cilié ne reste pas toujours tranquille dans sa position perpendiculaire au champ, mais il peut se plier en U ou en V. Pütter 1900 a confirmé l'observation de Verworn assurant que ce comportement résulte d'une interférence de la galvanotaxie et de la thigmotaxie. Cette interprétation a été ensuite complétée par Wallengren 1903 indiquant que ce phénomène doit être lié à une asymétrie du travail de la ciliature des côtés oral et aboral. Malheureusement, en réalité, la galvanotaxie dite transversale se produit bien sans contact du Cilié avec les corps solides, le corps se courbe autant bien vers le côté oral que vers le côté aboral et tout le comportement semble être plus compliqué que Verworn l'avait décrit. Le problème est resté donc inexpliqué et même inexploré jusqu'à présent.

Dans les recherches présentes on a utilisé la cuve et le montage électrique employés auparavant pour l'étude du comportement des Paramécies (Grębecki 1962). Dans cette cuve les lignes des forces du champ électrique sont parallèles. Une autre cuve analogue, mais miniaturisée, a été construite pour l'observation microscopique du battement ciliaire.

<sup>1</sup> Le seul exemple de la galvanotaxie anodique, concernant *Opalina ranarum*, rapporté par Wallengren 1902 et reproduit par Jennings 1906 exige sans doute une sérieuse révision expérimentale.

Avec une densité du courant égale à peu près à  $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  on peut observer le début de la réponse galvanotactique chez la plupart de Ciliés. Les cils de la partie antérieure de l'animal réagissent toujours les premiers à la stimulation. En observant sous le microscope à champ noir le travail de la ciliature, ralenti avec de la méthylcellulose, on constate que si l'animal était dirigé obliquement vers la cathode, l'effet de Ludloff 1895 apparaît sur son bout antérieur, l'orientant dans le sens homodrome (Fig. 1 A et Pl. I 3). Dans le cas où l'individu était orienté obliquement vers l'anode, l'effet de Ludloff se produit sous la forme de l'excitation anodique, réorientant aussi la partie antérieure (Fig. 1 B et Pl. I 4). Si l'animal se trouvait avant la fermeture du circuit en position transverse, un courant si faible ne provoque aucune réponse. En

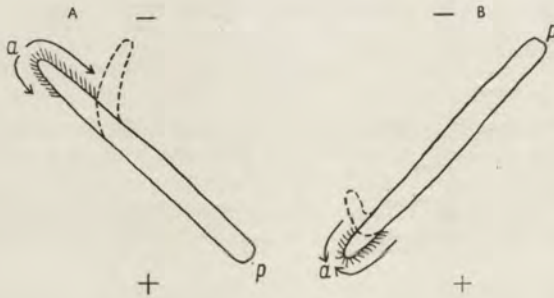


Fig. 1. Influence d'un courant faible sur la ciliature et le mouvement du *Spirostomum* tourné obliquement vers la cathode (A) ou vers l'anode (B). Les cils sont dessinés dans les régions excitées du corps, d'une façon indiquant le sens de leur battement; dans les régions inexcitées les cils ne sont pas visualisés. Les flèches indiquent les forces exercées par la ciliature excitée. Les silhouettes en lignes interrompues marquent les détours des animaux, qui en résultent

conséquence, dans un tel champ électrique, tous les animaux qui occupaient la position transverse avant la fermeture du circuit, ou qui ont gagné cette position en se détournant de la position antidrome, peuvent conserver un certain temps l'orientation perpendiculaire au champ électrique.

On peut en conclure que chez le *Spirostomum* la partie antérieure du corps est la plus sensible à la stimulation anodique, également comme à la stimulation cathodique<sup>2</sup>. Alors, dans un courant assez faible, les deux types de stimulation peuvent rester au dessous de leurs seuils, si l'animal occupe la position transverse. Chez la *Paramecie* le bout antérieur du corps est également le plus sensible à la stimulation cathodique (Kinoshita 1936), mais le gradient de l'excitabilité anodique reste inconnu; d'ailleurs le comportement du *Spirostomum* est basé aussi sur le principe découvert pour les *Paramecies* par Ludloff 1895 et expliqué par la théorie électrotonique de Jahn 1961.

En augmentant la densité du courant encore de quelques centaines de

<sup>2</sup> Il semble intéressant d'y noter, qu'après une contraction tétanique, la partie antérieure du *Spirostomum* regagne également la première sa contractilité normale (Kinastowski 1963).



$\mu\text{A}/\text{cm}^2$  on arrive à une manifestation simultanée de l'excitation cathodique et anodique aux deux bouts de l'animal. Elle apporte en effet une orientation homodrome du bout antérieur et postérieur à la fois. Le mécanisme ciliaire de cette réponse est illustré par la Fig. 2 et son image générale est présentée par les photographies (Pl. I 4 et 5). Les régions excitées du corps se comportent donc normalement, comme tout le corps des autres Ciliés, mais les régions inexcitées peuvent rester en repos ou même continuer leur mouvement préalable, ce qui doit compliquer l'image chez cet Infusoire si long et si flexible.

Avec une intensité de la stimulation égale à peu près à  $2000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  les animaux effectuent une contraction (même si on n'arrive que graduellement

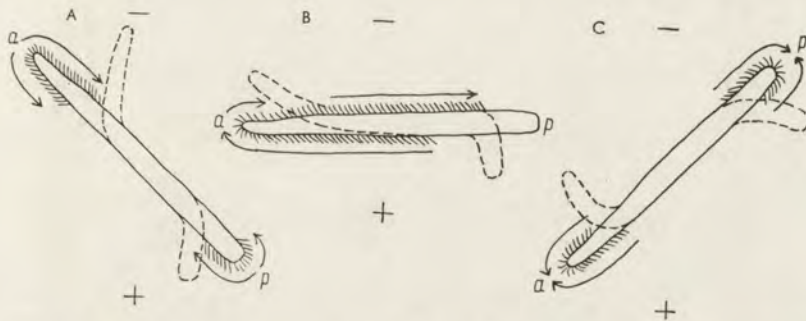


Fig. 2. Influence d'un courant modéré sur la ciliature et le mouvement du *Spirostomum* tourné obliquement vers la cathode (A), situé en position transverse (B) et tourné obliquement vers l'anode (C)

à la stimulation critique), mais tout de suite ils s'allongent de nouveau. Les champs d'excitation cathodique et anodique se rencontrent et il ne reste plus de régions inexcitées.

Les observations microscopiques démontrent que le champ de l'excitation cathodique s'étend de plus en plus en arrière en mesure de la densité du courant, dépassant enfin  $2/3$  de la longueur de l'animal, ce qui est conforme avec les résultats de Kamada 1931 concernant les Paramécies. Cela confirme donc mon opinion exprimée auparavant (Grębecki 1962) que la théorie de Jahn 1961, correcte en général, simplifie un peu la réalité exigeant que l'excitation cathodique s'arrête à la moitié du corps.

La rencontre de deux battements ciliaires opposés provoque dans cet endroit des tourbillons dans le milieu ambiant qui peuvent être photographiés (Pl. I 1) employant la technique d'enregistrement microphotographique (Grębecki 1961). La même technique visualise aussi les courants d'eau entourant la partie antérieure du corps de *Spirostomum* orientée vers la cathode (Pl. I 2).

La rencontre de l'excitation cathodique et anodique et le fait qu'il n'y ait plus de régions inexcitées le long du corps de ce grand et flexible Cilié, produit des phénomènes très compliqués. Essayons de les comprendre par-

tant d'un exemple de la réponse de *Spirostomum* à l'action d'un courant de  $8000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Le rebroussement cathodique des cils et leur activation anodique tendent à orienter l'animal vers la cathode (Pl. II 7); les cils antérieurs rebroussés et les postérieurs battant dans le sens normal causent une tension du corps (Fig. 3 A); il en résulte une flexion qui se produit dans la zone de la rencontre des cils rebroussés et normaux, c'est-à-dire dans un point qui se déplace en arrière si on intensifie la stimulation (Pl. II 8). Il en résulte la position en hameçon (Pl. II 9) décrite par Verworn 1896, mais ce n'est pas une position bien équilibrée et stable. La partie antérieure devient

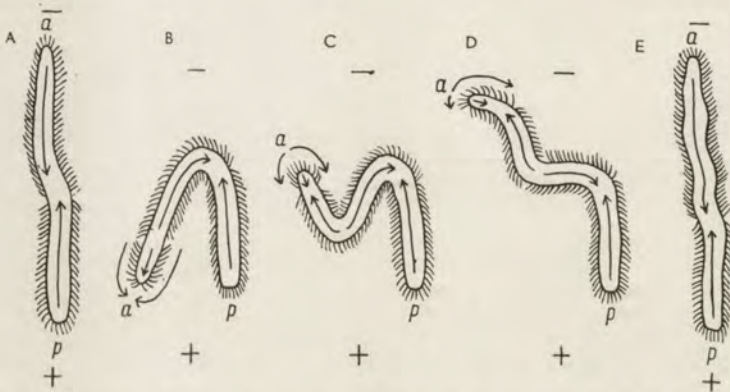


Fig. 3. Influence d'un courant fort sur la ciliature et le mouvement d'un *Spirostomum*. Les stades successifs de la réponse (A—E) sont décrits dans le texte

maintenant antidrome, donc l'excitation anodique y apparaît, renormalisant le battement des cils antérieurs (Fig. 3 B). En conséquence, le fragment antérieur du corps se réoriente encore une fois vers la cathode, compliquant la courbure du corps (Fig. 3 C et Pl. II 10). Alors encore une fois un rebroussement cathodique intervient au bout antérieur, repliant l'animal de nouveau (Pl. II 11). Enfin toutes les résultantes des forces exercées par les cils tendent au total à allonger l'animal qui revient à une position presque homodrome (Fig. 3 D, Pl. II 12 et 13). Or, c'est une situation presque identique à la situation initiale (Fig. 3 E et Pl. II 14) et tout le cycle doit recommencer. Donc, après le stade de la réponse en hameçon, le *Spirostomum* se plie et replie de nouveau, effectue des mouvements ondoyants, formant des figures différentes.

Le schémat du comportement dressé ci-dessus est un peu idéalisé. En réalité le jeu des cils opposés les uns aux autres donne très souvent en tant que résultante un détour de toute la figure, ce qui change naturellement les rapports entre la ciliature et le champ électrique, provoquant des nouvelles courbures.

Il est extrêmement intéressant qu'après une inversion de la direction du

courant, le Cilié "reconstruit" parfois sa position se repliant d'une façon entièrement symétrique à la figure préalable (Fig. 4)<sup>3</sup>.

On a étudié enfin le comportement dans le champ électrique de fragments de *Spirostomum* découpés transversalement. Si un morceau est suffisamment court (c'est-à-dire si sa longueur ne dépasse pas son diamètre de plus qu'environ 5 fois), la flexibilité ne peut pas intervenir, et le fragment se comporte normalement comme tous les autres Ciliés le font à l'ordinaire, c'est-à-dire il nage toujours vers la cathode. Les fragments antérieurs contenant les cils peristomaux et les fragments postérieurs privés de cette asy-

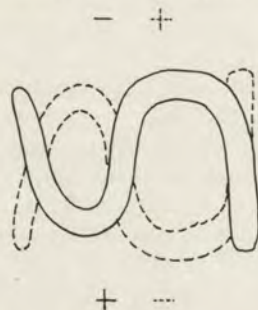


Fig. 4. Réponse d'un *Spirostomum* à l'inversion brusque de la direction d'un courant fort

métrie de la ciliature se comportent de la même façon. Également les animaux normaux qui subissent une longue contraction tétanique nagent le plus souvent tout droit vers la cathode.

Les trois dernières expériences démontrent que l'asymétrie de la ciliature orale et aborale ne peut jouer qu'un rôle supplémentaire dans le comportement de *Spirostomum* dans le champ électrique; d'ailleurs, même la tendance seule de l'animal à se replier doublement suffit à rejeter cette thèse de Wallengren.

Quelle que soit la complication de la figure formée par le *Spirostomum*, la partie postérieure conserve le plus souvent sa position homodrome et en conséquence elle reste stable, la partie antérieure effectuant des mouvements ondoyants. Les observations microscopiques du battement ciliaire démontrent que la partie antérieure de l'animal se comporte selon une règle constante: la position homodrome la soumet à une excitation cathodique rebroussant les cils, le rebroussement provoque sa flexion, la flexion la réoriente dans la direction antidrome, la position antidrome apporte une excitation anodique renormalisant les cils, la renormalisation ramène à la position homodrome, etc. En somme, c'est une interférence mutuelle et continue de l'effet cathodique et anodique, se produisant grâce à la longueur et à la flexibilité du corps de ce Cilié, qui explique son comportement en accord avec la théorie électrotonique de la galvanotaxie.

Ce principe du comportement est confirmé par la réponse présentée dans le champ électrique par *Dileptus anser*. Ce Cilié, muni d'un proboscis, nage

<sup>3</sup> Il arrive très souvent que l'inversion du courant agisse en tant que nouveau stimulant, provoquant encore une fois la contraction du Cilié; naturellement donc, dans ce cas le phénomène décrit ci-dessus ne peut pas se manifester.

normalement vers la cathode avec une vitesse décroissante en mesure de l'augmentation de l'intensité de la stimulation. Dans un courant suffisamment fort pour réduire le mouvement progressif au minimum, le proboscis commence à se plier et à ondoyer de la même façon que la partie antérieure d'un *Spirostomum*.

#### *Paramecium caudatum* — Galvanotaxie oblique

Les effets cathodiques et anodiques provoqués dans les régions antérieures et postérieures du corps de la Paramécie, par une stimulation électrique suffisamment intense, l'orientent tout simplement vers la cathode, étant donné que les dimensions de ce Cilié et surtout une considérable rigidité de sa pellicule préviennent les courbures observées chez *Spirostomum*. Cependant le même type de comportement peut se produire chez une Paramécie plongée dans du mucilage épais. Viaud et Bonaventure 1956 écrivent: „Si on inverse le courant, on la voit s'efforcer de s'orienter vers la nouvelle cathode et employer, pour le faire, un moyen tout différent des autres: elle se courbe, se plie grâce à ses myonèmes, comme ferait une Planaire qui oriente d'abord sa tête, que suit le reste de son corps.” Le comportement des Paramécies dans ces conditions spéciales est donc en accord avec l'explication de la galvanotaxie de *Spirostomum*.

Or, dans mes recherches sur la galvanotaxie des Paramécies j'ai trouvé dans les courants forts ( $>10000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) un type de comportement spécial qu'on peut appeler "la galvanotaxie oblique". L'enregistrement macrophotographique des trajets (technique de Dryl 1959) met nettement en évidence qu'après la fermeture du circuit, quand la plupart des Paramécies est déjà bien orientée (homodrome), plusieurs individus nagent obliquement au champ. Le phénomène n'est pas dû sans doute au hasard, car l'angle de la déviation reste le même chez tous les individus obliquement orientés dans chaque épreuve. Cet angle semble aussi peu sensible à l'intensité du courant (une stimulation très forte peut seulement diriger les animaux tout droit vers la cathode). Le plus extraordinaire dans ce comportement est ce que la déviation considérée se produit toujours à droite de la direction de la nage régulière; on ne voit pas d'individus déviés de la même manière à gauche (Pl. III 15).

Un phénomène analogue a été ensuite trouvé par Dryl 1962 qui a constaté que les Paramécies immergées dans une solution de  $\text{BaCl}_2$  et soumises à l'action du champ électrique entre les deux électrodes verticales, nagent à reculons vers l'anode suivant une ligne spirale. Cet auteur a donc découvert que la galvanotaxie oblique peut être obtenue régulièrement et en masse par un traitement chimique.

Connaissant ce résultat, on a cherché alors à la suite de l'étude présente, à provoquer la galvanotaxie oblique par l'action de cations, dans la cuve employée ici. On peut le faire avec tous les cations rebroussant le battement ciliaire (Oliphant 1938). Les ions  $\text{Ba}^{2+}$  sont vraiment remarquablement efficaces, mais l'effet semble également régulier avec des ions  $\text{K}^+$  (Pl. III 16).

En cherchant une explication de cette galvanotaxie oblique on peut revenir à Jennings 1906 qui rapporte que plusieurs Hypotriches peuvent se

placer obliquement au champ électrique; selon ses mots, le phénomène peut se produire parfois également chez les Paramécies attachées au fond de la cuve; Jennings est d'avis que les cils peristomaux, battant plus fort, peuvent écarter les animaux du sens homodrome.

Or, cette explication, valable peut-être pour les Hypotriches ayant l'habitude de ramper sur le fond, semble inacceptable dans le cas de Paramécies effectuant pendant leur nage des rotations qui anéantissent tout l'effet de l'asymétrie du corps. En effet, on voit parfois quelques individus, orientés obliquement, se glisser sur le fond sans rotations, mais la galvanotaxie oblique, en tant que phénomène régulier, se produit en pleine nage chez les individus roulant normalement autour de leurs axes.

Constatant l'inconvénience de l'explication de Jennings 1906 on peut se tourner vers celle de Dryl 1962. Cet auteur supposait avoir affaire à une interférence des champs électrique et magnétique. Étant donné que dans la cuve employée dans le travail présent les électrodes sont horizontales, le champ magnétique ne peut pas dans ce cas influencer le mouvement des Ciliés, qui sont toutefois également déviés à droite.

Ne trouvant d'explication ni dans les faits rapportés par Jennings ni dans l'expérience de Dryl, on ne peut encore dresser à présent aucune interprétation de la galvanotaxie oblique, laissant la solution de ce problème aux recherches futures.

### Résumé

Le comportement soi-disant transversal par rapport au champ électrique, décrit chez *Spirostomum ambiguum*, est basé sur le même principe que la galvanotaxie des Paramécies, c'est-à-dire que l'excitation cathodique et anodique tendent à orienter les parties excitées dans la direction homodrome. Pourtant, la longueur et la grande flexibilité du corps de ce Cilié, produisant des courbures différentes, effacent l'image d'une galvanotaxie régulière.

*Paramecium caudatum* soumis à l'action du courant présente souvent une galvanotaxie oblique. Le sens de la déviation de la direction homodrome et son angle sont constants pour tous les individus. Le mécanisme de la galvanotaxie oblique reste encore obscur.

### STRESZCZENIE

Opisane u *Spirostomum ambiguum* zachowanie się w polu elektrycznym, zwane transwersalnym, oparte jest na tej samej zasadzie, co galwanotaksja *Paramecium*, to znaczy na tym, że pobudzenie katodowe i anodowe prowadzą do ustawienia się części pobudzonych w kierunku homodromowym. Jednak znaczna długość i giętkość ciała tego orzęska wywołują rozmaite wygięcia, co zaciiera obraz prawidłowej galwanotaksji.

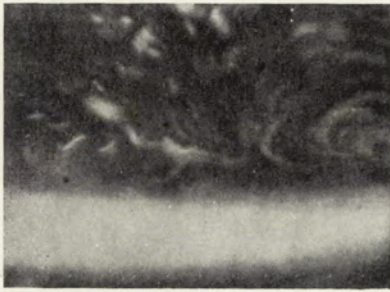
*Paramecium caudatum* poddane działaniu prądu często wykazuje galwanotaksję skośną. Znak i kąt odchylenia od kierunku homodromowego są stałe dla wszystkich osobników. Mechanizm galwanotaksji skośnej na razie jest niejasny.

## BIBLIOGRAPHIE

- Dryl S. 1959: Photographic registration of movement of Protozoa. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 7, 429—431.
- Dryl S. 1962: On the mechanism of induced "oblique" galvanotactic response in *Paramecium caudatum*. Proceed. I Intern. Conf. Protozool. Praha 1961 (sous presse).
- Grębecki A. 1961: L'enregistrement microphotographique des courants d'eau autour d'un Cilié. *Experientia* 17, 93—94.
- Grębecki A. 1962: Phénomènes électrocinétiques dans le galvanotropisme de *Paramecium caudatum*. Bull. Biol. Fr. B. (sous presse).
- Jahn T. L. 1961: The mechanism of ciliary movement. I. Ciliary reversal and activation by electric current. *J. Protozool.* 8, 369—380.
- Jennings H. S. 1906: Behavior of the lower organisms. New York.
- Kamada T. 1931: Polar effect of electric current on the ciliary movements in *Paramecium*. *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 2, 299—307.
- Kinastowski W. 1963: Der Einfluss der mechanischen Reize auf die Kontraktilität von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. *Acta Protozool.* 1 (sous presse).
- Kinosita H. 1936: Effect of change in orientation on the electrical excitability in *Paramecium*. *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 4, 189—194.
- Ludloff K. 1895: Untersuchungen über den Galvanotropismus. *Pflüger's Archiv* 59, 525—554.
- Pütter A. 1900: Studien über Thigmotaxis bei Protisten. *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt. Supplementband*, 243—302.
- Verworn M. 1896: Untersuchungen über die polare Erregung der lebendigen Substanz durch den konstanten Strom. III Mitteilung. *Arch. ges. Physiol.* 62, 415—450.
- Viaud G. et Bonaventure N. 1956: Recherches expérimentales sur le galvanotropisme des Paramécies. *Bull. Biol. Fr. B.* 90, 287—319.
- Wallengren H. 1902: Zur Kenntnis der Galvanotaxis. I. Die anodische Galvanotaxis. *Zeitschr. allg. Physiol.* 1, 341—384.
- Wallengren H. 1903: Zur Kenntnis der Galvanotaxis. II. Eine Analyse der Galvanotaxis bei *Spirostomum*. *Ibidem* 4, 516—555.

## EXPLICATION DES PLANCHES I—III

- 1, 2: Enregistrement microphotographique des courants d'eau entourant le corps d'un *Spirostomum* pendant sa réponse galvanotactique
- 3—4: Position prise par le *Spirostomum* dans un champ électrique faible
- 5—6: Position prise par le *Spirostomum* dans un champ électrique modéré
- 7—14: Stades successifs de la réponse de *Spirostomum* à une forte stimulation électrique. Description dans le texte
- 15: Galvanotaxie oblique chez *Paramecium caudatum* obtenue sans une intervention chimique
- 16: Galvanotaxie oblique chez *P. caudatum* provoqué par 10 mM KCl avec le courant de 3500  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . La plupart des individus progresse obliquement vers la cathode, les autres reculent obliquement vers l'anode démontrant une déviation différente, mais également constante



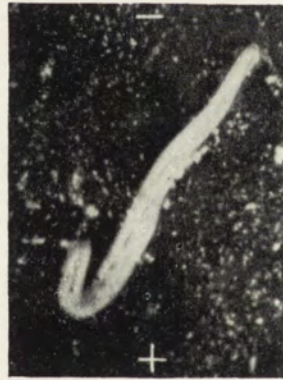
1



2



3



4



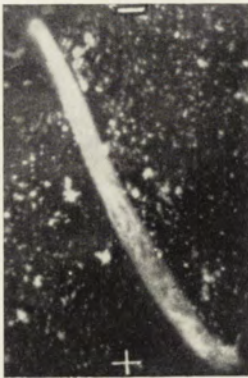
5



6

A. Grębecki

auctor phot.



7



8



9



10



11



12



13

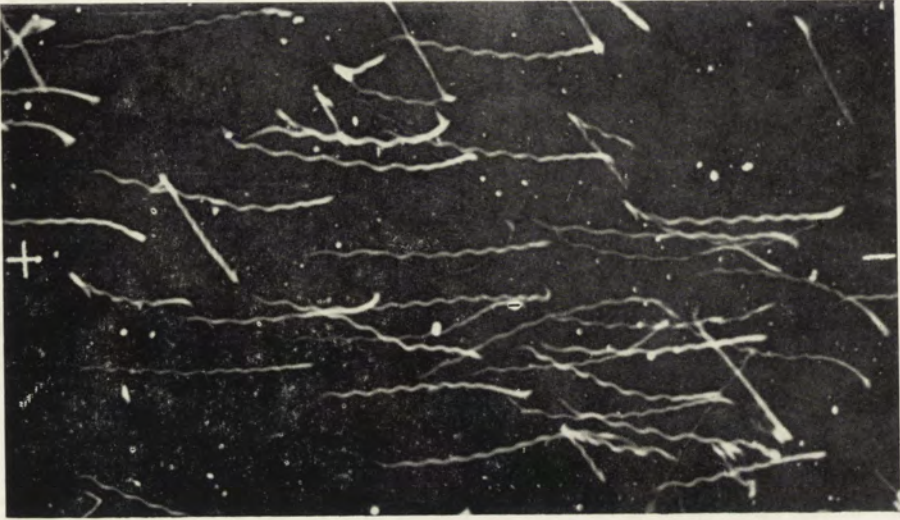


14

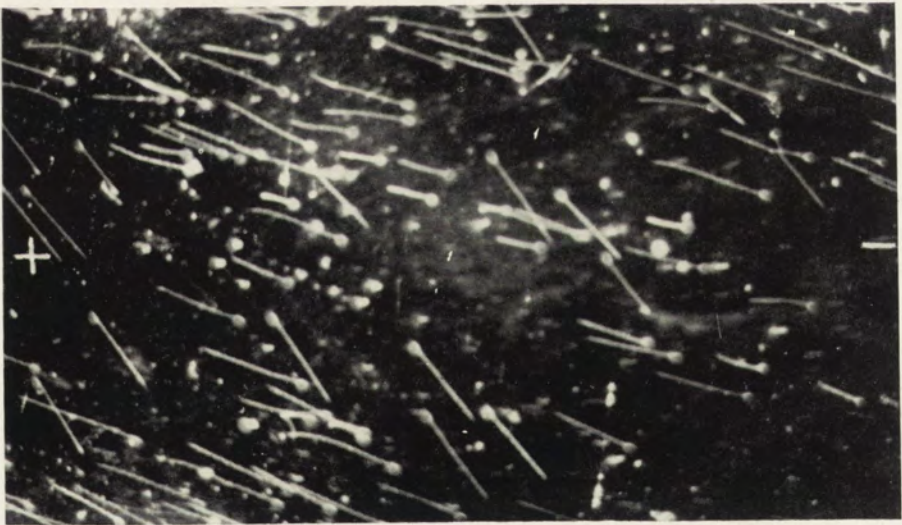
A. Grębecki

auctor phot.





15



16

A. Grębecki

auctor phot.



Laboratoire de Biologie générale de l'Institut M. Nencki de Biologie expérimentale,  
Académie Polonaise de Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Andrzej GRĘBECKI

## Rebroussement ciliaire et galvanotaxie chez *Paramecium caudatum*

Rewersja rzęskowa a galwanotaksja u *Paramecium caudatum*

Il est généralement admis d'après Ludloff 1895 que l'action du courant électrique sur les Paramécies est basée sur un rebroussement du battement ciliaire du côté de la cathode. D'autre part, on sait depuis longtemps (Mastand Nadler 1926) que plusieurs sels renversent également le travail de la ciliature. Apparemment il semble donc évident que la stimulation électrique et l'action des cations, employées à la fois, ne peuvent que se renforcer mutuellement. L'expérience démontre pourtant le contraire. Dans les recherches de différents auteurs (Kamada 1928, Viaud et Bonaventure 1956, Grębecki 1962a, Dryl 1962) on trouve des descriptions d'un phénomène de la renormalisation du battement ciliaire dans ce cas. La Paramécie nageant à reculons dans une solution de KCl, NaCl, BaCl<sub>2</sub>, etc. reprend la direction normale de son mouvement, dès la fermeture du circuit; le circuit ouvert, le rebroussement ciliaire réapparaît sur-le-champ. Il semble qu'une analyse d'un paradoxe peut élargir notre connaissance des deux phénomènes à première vue contradictoires.

### Caractère polyphasique de la galvanotaxie renormalisante

Les Paramécies utilisées dans les expériences décrites ci-dessous étaient introduites dans le tampon phosphate de Dryl 1961 à pH=7.0. Toutes les solutions de KCl (ou de CaCl<sub>2</sub>) étaient préparées également avec le même tampon.

La cuve et le montage électrique étaient presque identiques à ceux qu'on employait dans les recherches précédentes (Grębecki 1962a, 1962b et 1963). Une légère modification ne concernait que les électrodes qui ont été construites selon le système Ag/AgCl/agar et ont été séparés de l'espace libre de la cuve par deux plaques de porcelaine.

Le principe essentiel de la plupart des expériences était le suivant. On reemplissait la cuve avec du liquide contenant les Paramécies, jusqu'à la moitié de sa capacité; ensuite on complétait le contenu avec une solution donnée de KCl; après un temps défini, on fermait le circuit et enfin on commençait l'observation ou l'exposition photographique.

Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus le comportement des Paramécies dépend toujours de trois facteurs à la fois, notamment: C —

la concentration des ions  $K^+$  dans le milieu,  $t$  — le délai entre l'addition du sel et la fermeture du circuit,  $E$  — l'intensité de la stimulation électrique. Remettant une analyse détaillée de tous ces trois paramètres à la suite de ce travail, il faut tout d'abord dresser une image générale de la réponse observée. Pour l'obtenir il est convenant de conserver les facteurs  $C$  et  $t$  constants, ne changeant que l'intensité de la stimulation  $E$ . On peut alors nettement observer le caractère polyphasique de la galvanotaxie renormalisant le battement ciliaire.

Étant donné que les ions  $K^+$  changent fortement le seuil de la réponse galvanotactique (Grębecki 1962a), on n'obtient d'abord aucune uniformisation du mouvement des Paramécies. Tous les individus nagent à reculons dans des directions fortuites.

Dépasant le seuil de la réponse, on voit tous les animaux s'orienter dans la direction homodrome, mais leur ciliature travaille toujours à l'inverse. Il en résulte une galvanotaxie quasi-anodique, c'est-à-dire une nage vers l'anode effectuée en reculant.

Après avoir augmenté l'intensité du courant on voit que les animaux se trouvent déviés à droite de la direction anodique et qu'ils se mettent alors à nager obliquement vers l'anode avec une déviation définie et constante pour tous les individus. C'est la galvanotaxie oblique découverte dans notre laboratoire auparavant (D r y l 1962 et Grębecki 1963).

On arrive enfin à une intensité de la stimulation électrique qui renormalise le sens de la nage. À part les individus obliquement anodiques, on en aperçoit d'autres qui recouvrent la direction normale de leur mouvement et se dirigent obliquement vers la cathode. Leur nombre augmente, atteint 50% et enfin dépasse cette valeur (une photographie enregistrant une telle situation a été publiée dans le travail précédent — Grębecki 1963 — Pl. III 16).

Avec une stimulation encore plus forte, presque tous les Ciliés progressent obliquement vers la cathode, conservant toujours la déviation droite par rapport à la direction strictement cathodique. La nage à reculons vers l'anode devient exceptionnelle.

Enfin, la déviation oblique disparaît et on obtient une galvanotaxie à l'apparence typique, c'est-à-dire tous les animaux progressent normalement tout droit vers la cathode. (Cependant, on trouve presque toujours quelques individus nageant encore à reculons dans le sens obliquement anodique.)

Il faut noter ici qu'à part la galvanotaxie oblique on trouve également une galvanotaxie transversale. Plusieurs fois des individus assez nombreux nagent dans les deux directions exactement perpendiculaires aux lignes de forces du champ électrique. La photographie (Pl. I 1) présente les trajets enregistrés dans un échantillon manifestant à la fois le recul strictement ou obliquement anodique et la nage transverse. Ce type de comportement, bien connu chez le *Spirostomum*, n'a jamais été jusqu'à présent rapporté chez les Paramécies dans un courant constant. Les causes de la galvanotaxie transversale des Paramécies restent à présent purement conjecturales, les individus occupant une position transverse dans le champ ne sont donc pas pris en considération dans la suite de ce travail.

En résumant, on constate que la galvanotaxie renormalisante porte un caractère polyphasique et on peut énumérer ses stades de la manière suivante:

0. Absence de l'orientation galvanotactique,
1. Nage à reculons directement vers l'anode,
- 1a. Nage à reculons obliquement vers l'anode,
- 1/2. Nage oblique dans les deux directions,
- 2a. Nage progressant obliquement vers la cathode,
2. Nage progressant directement vers la cathode.

Les stades énumérés ci-dessus pour la galvanotaxie renormalisant un rebroussement dû aux ions  $K^+$  sont comparables aux stades observés par D r y l 1962 dans le cas de la galvanotaxie oblique induite par le  $BaCl_2$ .

Naturellement, le stade 0 peut être négligé, parce qu'il reste au dessous du seuil de la réponse. Le stade 1/2 n'exprime qu'un effet de groupe; on peut l'observer dans un échantillon car la sensibilité des animaux manifeste une

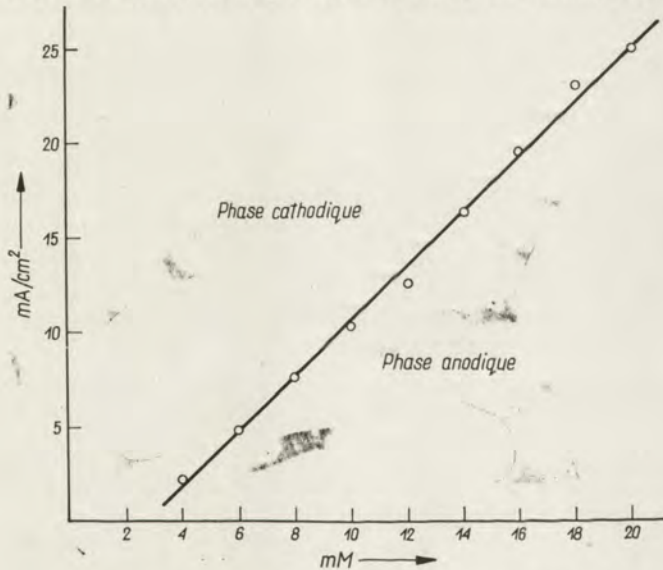


Fig. 1. Relation entre la densité minimale du courant renormalisant la moitié des cils ( $E$ ) et la concentration des ions  $K^+$  dans le milieu ( $C$ ). Chaque valeur  $E$  représente une moyenne de mesures concernant 50 individus

variation individuelle, mais d'ailleurs, chaque individu est renormalisé par une intensité bien définie du courant. Enfin, pour faciliter l'analyse du phénomène considéré, on peut simplifier son image en ne parlant qu'en général d'une phase anodique (stades 1 et 1a) et d'une phase cathodique (2a et 2).

En vue d'obtenir une caractéristique quantitative de la renormalisation électrique du mouvement inversé chimiquement, on mesurait l'intensité du courant renormalisant, en fonction de la concentration des ions  $K^+$  dans le milieu. Chaque mesure était prise 15 sec. après l'introduction du  $KCl$ . La stimulation minimale renormalisant la nage, était déterminée en tant que densité du courant suffisante pour arrêter le recul anodique d'un individu et nécessaire pour initier sa progression cathodique. Les résultats sont présentés par le diagramme (Fig. 1).

Il est évident que, si on augmente la concentration des ions  $K^+$  provoquant le rebroussement ciliaire, il devient de plus en plus difficile de le renormaliser. Il semble que la relation entre la concentration de l'ion et la densité du courant, suffisant pour égaler son influence, doit être assez simple, puisqu'elle s'exprime graphiquement sous la forme d'une ligne droite. Les coordonnées de chaque point disposé au dessous de cette ligne expriment les conditions correspondant à la phase anodique, le champ au dessus correspond à la phase cathodique.

On a étudié ensuite l'influence du facteur temps, conservant la concentration des ions  $K^+$  constante. On essayait donc de renormaliser la nage des Paramécies dans des temps différents après l'introduction de KCl (10 mM). On constate que la prolongation du délai entre l'introduction du KCl et la fermeture du circuit, réduit toujours l'intensité du courant nécessaire pour causer la renormalisation. Cette régularité est aisément compréhensible si on tient compte que même sans intervention d'autres facteurs, la Paramécie peut renormaliser le travail de sa ciliature tout en restant dans la solution du sel (O l i p h a n t 1938). La renormalisation électrique devient donc de plus en plus facile, au fur et à mesure de la renormalisation naturelle.

On peut se demander enfin, si le passage même du courant par la cellule de la Paramécie n'altère pas l'état d'équilibre entre les cils rebroussés et renormalisés. Il s'agit donc de constater, si on peut reproduire plusieurs fois le même procédé avec une seule Paramécie, en obtenant toujours la même valeur minimale du courant renormalisant.

Table 1

Intensités du courant équilibrant la ciliature après une stimulation électrique plus intense. Tous les chiffres représentent les densités du courant exprimées en mA/cm<sup>2</sup>.

1 <sup>er</sup> équilibrement à:	Stimulation jusqu'à:	2 <sup>e</sup> équilibrement à:	Stimulation jusqu'à:	3 <sup>e</sup> équilibrement à:
8.1	9.8	8.3	9.5	8.2
8.5	9.9	8.4	10.3	8.5
10.3	12.0	10.3	31.7	25.2
7.6	24.6	12.0	34.0	26.2
11.5	25.1	14.3	32.0	25.7

Dans ce but on dépassait l'intensité critique du courant, ensuite on revenait à l'équilibre, puis on diminuait encore le courant, on l'augmentait de nouveau, etc. Les résultats sont présentés par la Table 1 montrant les exemples de comportement de 5 individus. On voit que, si on agit doucement, l'intensité minimale du courant renormalisant reste à peu près constante; cependant, un courant très fort l'augmente considérablement.

Probablement, dans ce deuxième cas, le courant endommage la membrane cellulaire: il augmente sa perméabilité, c'est-à-dire il altère sa conductance électrique. Un tel endommagement de la membrane a été déjà rapporté par Naitoh 1959 chez *Opalina*. En conséquence, la dépolarisation électrique

de la membrane devient plus facile et on sait d'autre part (Kinoshita 1954 et Naitoh 1958) que c'est justement la dépolarisation que est responsable du rebroussement ciliaire. Cela peut donc expliquer pourquoi, après l'action d'un courant fort, les cils deviennent beaucoup plus susceptibles au rebroussement.

### Cinétique de la phase anodique

Pour caractériser le comportement des Paramécies dans la phase anodique, on calculait le pourcentage des individus reculant vers l'anode, la vitesse de leur nage et enfin l'angle de leur déviation oblique.

Table 2

Caractéristique quantitative du recul anodique pendant la galvanotaxie renormalisante

Intensité mA/cm <sup>2</sup>	1.5	2.75	4	6	8	10	12	15	20	25
Vitesse μ/sec.	706 ± 74	438 ± 52	413 ± 37	382 ± 33	370 ± 24	361 ± 30	358 ± 41	343 ± 36	327 ± 39	—
Angle de la déviation	0° ± 43°	0° ± 11°	22° ± 6°	36° ± 5°	51° ± 3°	54° ± 2°	53° ± 3°	56° ± 1°	55° ± 2°	—
Nombre d'individus	53%	99%	97%	88%	60%	47%	41%	26%	6%	3%

Toutes les mesures étaient prises 15 sec. après l'introduction du KCl à une concentration finale de 10 mM. La densité du courant variait de 1.5 mA/cm<sup>2</sup> à 25 mA/cm<sup>2</sup>. Dans ces conditions on enregistrait photographiquement les trajets parcourus par les Paramécies pendant 5 sec., prenant au moins 10 poses pour chaque intensité de la stimulation. Sur les photographies on calculait d'abord le nombre d'animaux nageant dans le sens anodique. S'il dépassait 50%, on mesurait la vitesse et l'angle de l'orientation, en tant que moyennes prises de 50 individus. Les résultats du calcul sont présentés dans la Table 2.

On constate que, chez les Paramécies incubées pendant 15 sec. dans 10 mM KCl, la nage à reculons vers l'anode n'apparaît qu'au dessus de 1.5 mA/cm<sup>2</sup>. Avec 2.75 mA/cm<sup>2</sup> cette réponse est déjà presque parfaitement uniforme. Après, elle se réduit graduellement et elle n'atteint que 50% entre 8 mA/cm<sup>2</sup> et 10 mA/cm<sup>2</sup>, ce qui est en accord avec les valeurs obtenues dans le premier expérience (Fig. 1). Au dessus de 20 mA/cm<sup>2</sup> le recul anodique devient exceptionnel.

Au dessous du seuil de la réponse galvanotactique (1.5 mA/cm<sup>2</sup>) la vitesse de la nage des Paramécies étudiées était égale à 700 μ/sec. Elle tombe brusquement avec le début du mouvement orienté et ensuite la nage est graduellement ralentie en fonction de la densité du courant. Les changements de vitesse dans la phase anodique sont donc analogues aux changements observés aupara-

vant (Kamada 1931, Viaud et Bonaventure 1956 et Grębecki 1962a) dans le cas de la galvanotaxie normale.

La nage à reculons n'est strictement anodique qu'au début de la réponse. La déviation oblique apparaît et augmente très vite, si on intensifie la stimulation, les animaux se trouvant déviés de cinquante quelques degrés.

### Cinétique de la phase cathodique

On se sert de l'enregistrement photographique effectué auparavant pour calculer les mêmes caractéristiques de la nage cathodique, ce qui est visualisé par la Table 3.

Table 3

Caractéristique quantitative de la progression cathodique pendant la galvanotaxie renormalisante

Intensité mA/cm <sup>2</sup>	1.5	2.75	4	6	8	10	12	15	20	25
Vitesse μ/sec.	680 ±67	—	—	236 ±43	254 ±41	330 ±30	361 ±35	385 ±38	411 ±29	420 ±27
Angle de la déviation	0° ±47°	—	—	17° ±5°	19° ±3°	22° ±3°	20° ±1°	21° ±7°	0° ±8°	1° ±6°
Nombre d'individus	47%	1%	3%	12%	40%	53%	59%	74%	95%	97%

Les premiers individus progressant vers la cathode apparaissent déjà avec 4 mA/cm<sup>2</sup>, ils constituent naturellement la moitié du groupe entre 8 mA/cm<sup>2</sup> et 10 mA/cm<sup>2</sup> et la réponse cathodique devient presque uniforme au dessus de 20 mA/cm<sup>2</sup>.

La progression cathodique est d'abord très lente, mais ensuite elle augmente régulièrement, si on intensifie le courant. Donc, dans ce cas, la vitesse du mouvement change dans le sens opposé en comparaison avec la galvanotaxie normale, en dépit du sens normal de la nage.

Les Paramécies dans la phase cathodique sont d'abord déviées à droite de 20 degrés d'environ et dans les courants très forts elles se dirigent directement vers la cathode.

### Observation du travail ciliaire

Pour comprendre le mécanisme de l'orientation des animaux par leurs bouts postérieurs vers l'anode, du ralentissement graduel du recul anodique, de l'arrêt passager de tout le mouvement, de l'accélération de la progression cathodique en fonction de l'intensité du courant et enfin de phénomène essentiel de la renormalisation électrique des cils rebroussés chimiquement, il faut se rendre aux observations du battement ciliaire.



Dans ce but on se servait de trois techniques différentes:

1. On analysait le battement des cils ralenti avec de la méthylcellulose;
2. On observait les cils travaillant de façon normale chez les *Paramecies* emprisonnées dans les minuscules „baignoires” formées du gel; Statkevitch 1904 et Viaud et Bonaventure 1956 se servaient dans ce but du mucilage de *Plantago psyllium*; on l'avait substitué ici par le gel d'agar recommandé par Bullough 1946;

3. On analysait les courants d'eau provoqués par les cils dans une émulsion de graisse (Grębecki 1961). Plusieurs fois, la troisième technique a été employée en combinaison avec la première.

En ce qui concerne le phénomène de la renormalisation électrique même, il suffit de mentionner que le sens du battement ciliaire redevient normal toujours du côté de l'anode. La renormalisation est donc due à l'effet anodique, de même que, dans les conditions normales, le rebroussement s'effectue en force de l'effet cathodique.

La région renormalisée „entoure” toujours la partie de l'animal tournée justement vers l'anode. Cette région, délimitée par une ligne perpendiculaire aux lignes des forces du champ électrique, s'élargie en fonction de l'intensité

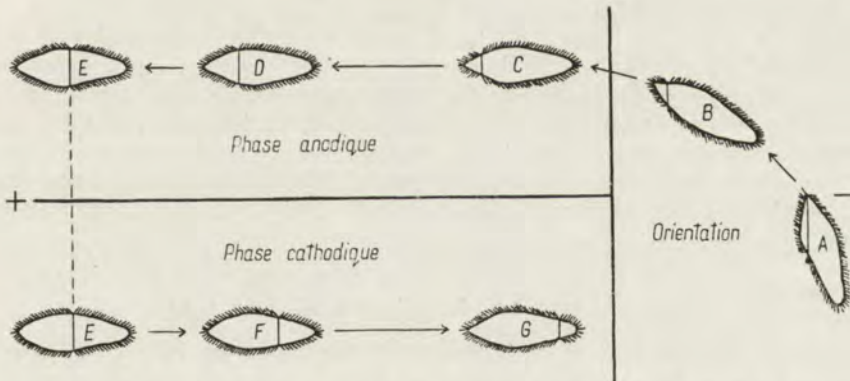


Fig. 2. Schémat illustrant le mécanisme ciliaire et la cinétique de la galvanotaxie renormalisante. Explications dans le texte

de la stimulation. Ce n'est donc qu'un effet de Ludloff 1895, bien typique, mais réalisé à l'inverse: on voit ici un anélectrotonus renormalisant les cils rebroussés (au lieu d'avoir affaire à un cathélectrotonus rebroussant les cils battant dans la direction normale). Tenant compte que toute la situation est également inverse à la normale, car l'animal nage à reculons, il ne peut arriver autre chose qu'un détour orientant le bout postérieur de la *Paramecie* vers l'anode. Ce mécanisme de l'orientation de l'animal dans le cas de la galvanotaxie quasi-anodique est expliqué par le dessin (Fig. 2 A, B, C).

Sachant qu'à la phase du recul anodique la renormalisation anélectrotonique augmente avec l'intensité du courant, on comprend aisément pourquoi dans les champs plus forts ce recul devient de plus en plus lent (Fig. 2 C, D, E). Le phénomène, en ce qui concerne sa manifestation et ses causes, est donc entièrement analogue au ralentissement de la progression cathodique au cours

de la galvanotaxie ordinaire, étudiée sous cet égard par Kamada 1931, Viaud et Bonaventure 1956 et Grębecki 1962a.

Avec un courant défini la force exercée par les cils renormalisés devient égale à la force de cils rebroussés (Fig. 2E). C'est alors cette valeur de la stimulation qui est suffisante et nécessaire pour forcer les Paramécies à rouler autour leurs axes sans guère progresser ni reculer.

La phase de la progression cathodique commence si la renormalisation anélectronique l'emporte sur le rebroussement chimique. Le champ renormalisé peut s'élargir encore plus, donc, si on intensifie la stimulation, on accélère la nage (Fig. 2E, F, G). On voit donc que la vitesse de la progression cathodique augmente dans ce cas en fonction de l'intensité du courant, au lieu de diminuer, parce qu'elle se manifeste sous l'influence décisive d'un anélectrotonus, au lieu de se réaliser en présence prédominante d'un cathélectrotonus.

Il faut cependant y ajouter qu'on n'a jamais observé une pleine renormalisation anélectrotonique; même dans les courants très intenses (naturellement, au dessous de l'intensité désintégrant la cellule) on aperçoit toujours un champ de cils rebroussés, au bout antérieur du corps. La situation est donc, aussi sous cet égard, analogue à la galvanotaxie normale, où un cathélectrotonus ne peut jamais renverser le battement de toute la ciliature, la région caudale y comprise (Grębecki 1962a).

Ainsi, l'analyse du travail de la ciliature nous fait comprendre le mécanisme et le fond physiologique de la galvanotaxie chez les Paramécies subissant un rebroussement chimique du battement ciliaire. D'ailleurs, la cinétique de ce comportement n'y est pas expliquée entièrement, car les observations n'ont toujours pas donné de renseignements suffisamment précis sur la nature de la déviation oblique. Pour cette raison le schéma dressé sur la Fig. 2 a été simplifié, ne tenant pas compte du phénomène de la galvanotaxie oblique.

#### Interférence des ions $K^+$ et $Ca^{2+}$

Dans la série suivante d'expériences on employait un autre moyen d'étudier la galvanotaxie en présence des ions  $K^+$  et des ions antagonistes:  $Ca^{2+}$ . La technique était identique à celle employée auparavant dans l'étude du rôle du pH (Grębecki 1962b). Au milieu de la cuve, contenant un tampon phosphate à pH = 7.0 et les Paramécies ramassées d'un côté, on posait une goutte de la substance étudiée. Ensuite, en fermant le circuit, on dirigeait les animaux nageant vers une électrode, à la rencontre de la goutte.

On commença par des observations du comportement des Paramécies normales, c'est-à-dire progressant vers la cathode dans le tampon employé à l'ordinaire. Considérons d'abord le cas où la goutte contenait une solution de KCl (dissolu dans le même tampon). Si la concentration de KCl n'atteint pas 2 mM d'environ, les Paramécies continuent leur nage traversant librement la goutte.

Rencontrant des solutions plus concentrées, les Paramécies s'arrêtent dans la zone, où l'action rebroussante des ions  $K^+$  et l'effet renormalisant de l'excitation anodique deviennent égaux. Connaissant l'intensité du courant employé, on pourrait donc probablement définir la concentration de  $K^+$  dans la zone d'arrêt, partant de données exprimées par le diagramme construit au com-

mencement de ce travail (Fig. 1). En effet, si le courant devient plus intense, le demi-anneau des animaux arrêtés se rapproche du centre de la goutte, surmontant le gradient de  $K^+$ . Enfin on peut faire passer les Paramécies à travers la goutte, en augmentant l'intensité du courant au dessus de la valeur suffisante, d'après la Fig. 1, à équilibrer la ciliature dans la concentration de  $K^+$  employée dans l'expérience.

Naturellement, en accord avec le diagramme, si la concentration du KCl introduit dépasse quelques dizaines mM, un courant même extrêmement fort ne peut pas forcer les animaux à y pénétrer. Les ions  $K^+$  peuvent donc former un barrage infranchissable pour les Paramécies progressant vers la cathode au cours de la galvanotaxie normale.

L'image obtenue après l'introduction analogue de solution de  $CaCl_2$ , est tout à fait différente. On observe une „avoiding reaction”, mais elle ne dure qu'un instant. En principe, la goutte contenant les ions  $Ca^{2+}$  n'empêche jamais les Paramécies de rejoindre la cathode. Elles peuvent tout au plus perdre l'orientation, ou être tuées, entrant librement dans une solution trop concentrée.

La réponse présentée par les Paramécies dans le champ électrique à la rencontre des ions  $K^+$  est donc la même qu'à la rencontre du pH acide; d'autre part, les Paramécies traversent les solutions riches en  $Ca^{2+}$  de la même façon que les tampons alcalins. Le comportement est si semblable qu'on a jugé inutile de l'enregistrer, les photographies publiées auparavant (Grebecki 1962b) pouvant aussi bien illustrer les phénomènes décrits dans le travail présent.

Toute la situation devient, comme toujours, inverse, s'il s'agit d'animaux subissant un rebroussement ciliaire. La technique d'expériences était dans ce cas identique, sauf que le tampon phosphate, constituant le milieu initial, contenait 20 mM de KCl, ce qui provoquait une nage à reculons vers l'anode durant quelques minutes. Ce délai suffisait pour poser sur le chemin des Paramécies des gouttes contenant le  $CaCl_2$  ou le KCl (plus concentré que dans le milieu ambiant).

Cette fois-ci ce sont les ions  $K^+$  qui ne présentent aucun obstacle. Les Paramécies reculant vers l'anode pénètrent même dans des solutions toxiques de KCl. Au contraire, les solutions de  $CaCl_2$  deviennent inaccessibles. La seule différence entre la barrière de  $K^+$  superposée à la progression cathodique et la barrière de  $Ca^{2+}$  arrêtant le recul anodique, se réduit au fait que l'effet des ions  $Ca^{2+}$  se manifeste même dans leurs moindres concentrations: cela reste d'ailleurs en accord avec les résultats de Bancroft 1906 et de Kamada 1940 constatant que même des traces des ions  $Ca^{2+}$  agissent de manière antagoniste par rapport aux ions  $K^+$ .

On peut illustrer les régularités décrites ci-dessus en se servant d'elles pour provoquer un comportement spectaculaire enregistré sur les photographies. On dispose du côté de la cathode une quantité de solution de KCl, et de  $CaCl_2$  du côté de l'anode; dans ce cas, les Paramécies de la région cathodique reculent vers l'anode jusqu'à rencontrer les ions  $Ca^{2+}$ ; les autres, nageant près de l'anode, progressent vers la cathode, mais elles s'arrêtent après avoir rencontré une concentration définie des ions  $K^+$ . En effet, dès la fermeture

du circuit, toutes les Paramécies se groupent au centre de la cuve (Pl. I 2). Mettant le KCl du côté de l'anode et le CaCl<sub>2</sub> près de la cathode, on force les Paramécies à se comporter de façon inverse: elles se dissipent vers les deux extrémités de la cuve (Pl. I 3).

### Discussion

Ce qui est le plus frappant dans toutes les expériences décrites dans le travail présent, c'est le caractère universel de l'orientation homodrome des Paramécies dans le champ électrique. Les ions K<sup>+</sup> agissant sur le potentiel intracellulaire et inversant le sens du battement ciliaire, ne peuvent diriger les animaux vers l'anode qu'à reculons, c'est-à-dire laissant l'anterieur de l'animal tourné toujours vers le pôle négatif et le postérieur vers le pôle positif du champ.

Bancroft 1906 obtenait dans les solutions de KCl une orientation antidrome provoquant une galvanotaxie vraiment anodique, ce que a été ensuite confirmé par Kamada 1928 et par Viaud et Bonaventure 1956. Or, tous ces chercheurs travaillaient sans stabiliser le niveau de Ca<sup>2+</sup> durant l'expérience; le tampon phosphate employé dans le travail présent contenait toujours 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. On peut en supposer qu'une telle quantité de ions Ca<sup>2+</sup> prévient la manifestation de l'orientation antidrome et, sous ce rapport, le problème de la galvanotaxie vraiment anodique doit être encore réexaminé.

L'effet de l'anode et de la cathode restent tout à fait normaux chez les Paramécies nageant à reculons sous l'influence d'un superflu de K<sup>+</sup> dans le milieu; on peut parler dans ce cas d'un cathélectrotonus inversant le battement des cils et d'un anélectrotonus le renormalisant d'une manière typique. En effet, la renormalisation des cils rebroussés chimiquement est due à l'effet anodique.

L'orientation galvanotactique du bout postérieur de l'animal vers l'anode s'accomplit, comme toujours, grâce à l'effet de Ludloff 1895, quoique il se manifeste cette fois-ci sous la forme d'une renormalisation anodique. Toutes ces régularités nous assurent, que la galvanotaxie quasi-anodique des Paramécies reculantes peut être aussi bien expliquée, en l'essentiel, par la théorie électrotonique de John 1961, que la galvanotaxie ordinaire.

L'interférence du cathélectrotonus et de l'anélectrotonus d'une part et des effets des ions K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> de l'autre, est très régulière et constante dans toutes les situations étudiées.

On peut en conclure que l'influence d'un superflu de K<sup>+</sup> dans le milieu ambiant s'oppose à l'excitation anodique, car elle peut être réduite ou supprimée par un anélectrotonus, ou bien elle peut elle-même prévaloir un anélectrotonus. De plus, les ions K<sup>+</sup> à l'extérieur agissent de la même manière qu'un cathélectrotonus, car les deux facteurs: 1. s'opposent à l'anélectrotonus, 2. rebroussent le battement ciliaire, 3. dépolarisent la membrane cellulaire du Protiste (*Paramecium* — Kamada 1934 et Yamaguchi 1960, *Opalina* — Kinoshita 1954, Naitoh 1958 et Ueda 1961a), 4. ne peuvent pas se manifester en l'absence totale de Ca<sup>2+</sup>, mais ils sont entravés par un superflu de Ca<sup>2+</sup> (Kamada 1940 et Ueda 1961b).

Partant de prémisses énumérées ci-dessus on peut appeler K<sup>+</sup> un ion à l'action cathélectrotonique et considérer le Paramécies, soumises à son superflu

dans le milieu, en tant que cellules introduites dans un état de cathélectrotonus<sup>1</sup>. Probablement il faut englober dans la catégorie de ions cathélectrotoniques tous les autres ions provoquant un rebroussement ciliaire continu (Mast and Nadler 1926, Oliphant 1938 et 1942).

D'autre part, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  agissent d'une manière tout à fait semblable à un anélectrotonus, étant donné que: 1. leur présence s'oppose au cathélectrotonus, entravant le rebroussement cathodique des cils antérieurs pendant la galvanotaxie normale (Ueda 1961b), 2. leur superflu renormalise chaque rebroussement ciliaire, soit purement chimique (Kamada 1940), soit obtenu dans un champ électrique (ce qui a été constaté dans le travail présent), 3. ils provoquent une hyperpolarisation de la membrane cellulaire des Protistes (*Paramecium* — Yamaguchi 1960, *Opalina* — Ueda 1961a), 4. ils agissent d'une manière antagoniste par rapport aux ions  $\text{K}^+$ .

Tous ces faits nous permettent de donner au  $\text{Ca}^{2+}$  le nom d'un ion à l'action anélectrotonique et, en conséquence, de considérer l'augmentation du potentiel intracellulaire négatif par cet ion en tant qu'accentuation de l'état anélectrotonique de la cellule. Les données dispersées dans la bibliographie du sujet nous font croire, que l'effet des ions  $\text{Mg}^{2+}$  a également un caractère anélectrotonique, bien qu'il soit beaucoup plus faible<sup>2</sup>.

Le rôle cathélectrotonique de  $\text{K}^+$  et le rôle anélectrotonique de  $\text{Ca}^{2+}$  reconnus, on peut revenir à l'interprétation des faits obtenus dans le travail présent du point de vue de la théorie électrotonique de Jahn 1961. Il a été déjà souligné auparavant (Grębecki 1962a et 1963) que cette théorie contient la prémisse d'une susceptibilité égale de la Paramécie à la stimulation cathodique ainsi qu'à la stimulation anodique.

Cela peut être représenté graphiquement en dessinant les lignes des forces du champ électrique pénétrant la pellicule des deux côtés (Fig. 3 A). En conséquence, le champ de l'excitation cathodique rebroussant les cils et le champ de l'excitation anodique qui les renormalise, ne devraient jamais arriver qu'à la moitié du corps (Fig. 3 D).

En réalité, une telle image n'est que transitoire, car le rebroussement cathodique dépasse cette ligne pendant la galvanotaxie normale, ce qu'on peut trouver sur le dessin de Kamada 1931 (Fig. 3 E). En corrigeant donc le dessin des lignes des forces du champ, on obtient l'image présentée par la Fig. 3-B, indiquant que la Paramécie normale est plus sensible à un cathélectrotonus qu'à un anélectrotonus. Cette conclusion est en accord avec le reste de mesures de Kamada 1931, et avec le résultat de Naitoh 1958 constatant que, chez *Opalina*, la dépolarisation cathodique est beaucoup plus grande que la hyperpolarisation anodique, obtenue avec le même courant.

<sup>1</sup> Fabre 1947 en observant l'abolissement de toute la galvanotaxie par le citrate trisodique (phénomène, d'ailleurs, remarqué déjà par Bancroft 1906) le considère justement en tant qu'un cathélectrotonus chimique. Le fait même peut être bien reproduit (Grębecki 1962a et 1962b), pourtant, étant donné que le citrate supprime toute l'excitation électrotonique, il fallait plutôt donner à son effet le nom: „atonique”.

<sup>2</sup> On peut y ajouter que l'effet de la stimulation cathodique et anodique et l'effet des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sont presque entièrement analogues dans le cas de cellules nerveuses et musculaires (voire: Shedlovsky 1955). Peut-être donc, les considérations présentés ci-dessus sont valables dans un degré défini pas seulement pour les Protistes, mais aussi pour les autres cellules excitables.

On a vu dans le travail présent que la renormalisation anodique des cils rebroussés chimiquement, peut aussi dépasser la moitié du corps (Fig. 3 F). Le dessin des lignes des forces qui peut correspondre à une telle situation est présenté par la Fig. 3 C, ce qui nous fait supposer qu'une *Paramécie* subissant un rebroussement ciliaire est, au contraire, plus sensible à l'effet anélectrotonique qu'à l'effet cathélectrotonique. Cette conclusion s'accorde bien à tous les résultats rapportés dans le travail présent.

On peut proposer une assez simple explication des régularités considérées. Etant donné que le potentiel intracellulaire négatif est soutenu, en premier lieu, par un superflu de  $K^+$  à l'intérieur de la cellule, il semble évident qu'il

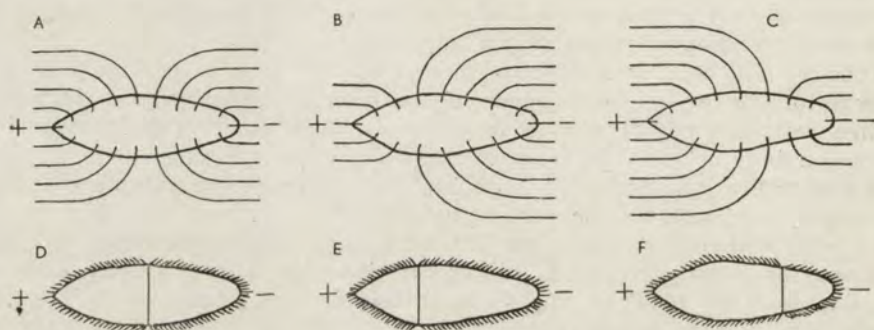


Fig. 3. Les lignes des forces du champ traversant la pellicule de la *Paramécie* dessinées en accord avec la théorie de Jahn 1961 (A), dérivées du comportement de la *Paramécie* normale (B) et du comportement de la *Paramécie* subissant un rebroussement ciliaire (C); le comportement de la ciliature correspondant au schéma de Jahn (D), son comportement réel chez une *Paramécie* normale dessiné d'après Kamada 1931 (E) et son comportement chez une *Paramécie* aux cils rebroussés (F)

soit plus facile d'agir en accord à cette chaîne de concentrations de  $K^+$ , que de s'y opposer. Autrement dit, il soit plus facile de faire sortir le superflu de ions  $K^+$  à l'extérieur (en dépolarisant la membrane), c'est-à-dire de provoquer un cathélectrotonus.

On sait que le rebroussement ciliaire est lié à une dépolarisation de la membrane (Kinoshita 1954 et Naitoh 1958) et qu'un superflu suffisant de  $K^+$  à l'extérieur peut donner un potentiel intracellulaire positif (Yamaguchi 1960 et Ueda 1961a). Donc, il est plus facile, dans ce cas, de faire entrer les ions  $K^+$  dans la cellule (en repolarisant la membrane), c'est-à-dire de provoquer un anélectrotonus chez la *Paramécie* subissant un rebroussement ciliaire.

Les thèses présentées ci-dessus sont en plus directement confirmées par l'expérience importante de Ueda 1961b qui a démontré que la membrane cellulaire de *Opalina* normale se comporte comme un redresseur en manifestant une résistance électrique considérablement plus élevée à un courant entrant dans la cellule qu'à un courant sortant de la cellule.

Le principe de l'augmentation de la sensibilité cathélectrotonique chez une *Paramécie* normale et de l'augmentation de la sensibilité anélectrotonique chez

une Paramécie subissant le rebroussement ciliaire, ne peut que développer les idées exprimées par Jahn 1961, étant donné qu'il est basé sur les notions essentielles de sa théorie électrotonique de la galvanotaxie.

### Résumé

La renormalisation électrique des cils rebroussés chimiquement est due à un anélectrotonus. L'effet de Ludloff 1895 s'y produit, donc la galvanotaxie manifestée dans ces conditions sous la forme d'un recul vers l'anode peut être expliquée par la théorie électrotonique de Jahn 1961.

L'effet des ions  $K^+$  est défini en tant qu'un cathélectrotonus chimique, l'effet des ions  $Ca^{2+}$  — en tant qu'un anélectrotonus chimique. La théorie de Jahn peut être complétée, en constatant qu'une Paramécie normale est plus sensible à un cathélectrotonus, tandis qu'une Paramécie cathélectrotonisée devient plus sensible aux effets anélectrotoniques.

### STRESZCZENIE

Elektryczna renormalizacja rzęsek znajdujących się w rewersji chemicznej zachodzi dzięki działaniu anelektrotonusa. Powstaje efekt Ludloffa 1895, wobec czego galwanotaksja przejawiająca się w tych warunkach pod postacią ruchu wstecznego ku anodzie może być tłumaczona przy pomocy teorii elektrotonicznej Jahn'a 1961.

Działanie jonów  $K^+$  określono jako katelektrotonus chemiczny, a działanie jonów  $Ca^{2+}$  — jako anelektrotonus chemiczny. Teoria Jahn'a może być uzupełniona stwierdzeniem, że pantofelek normalny jest wrażliwszy na katelektrotonus, podczas gdy pantofelek wprowadzony w stan katelektrotoniczny staje się wrażliwszy na oddziaływania anelektrotoniczne.

### BIBLIOGRAPHIE

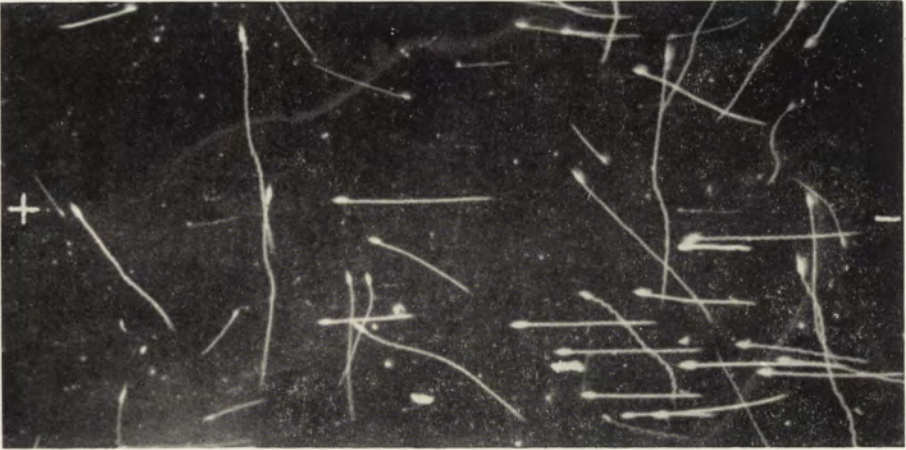
- Bancroft F. W. 1906: On the influence of the relative concentration of calcium ions in the reversal of the polar effects of the galvanic current in *Paramecium*. J. Physiol. 34, 444—463.
- Bullough W. S. 1946: Agar technique for arresting movement in *Protozoa*. Science 104, 227.
- Dryl S. 1959: Photographic registration of movement of *Protozoa*. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 7, 429—431.
- Dryl S. 1961: The velocity of forward movement of *Paramecium* in relation to pH of medium. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Dryl S. 1962: On the mechanism of induced "oblique" galvanotactic response in *Paramecium caudatum*. Proc. Ist. Conf. Protozool. Praha 1961 (sous presse).
- Fabre P. 1947: Particularités du mouvement des Paramécies decalcifiées par le citrate de Sodium. Galvanotropisme indifférent. C. R. Soc. Biol. 136, 332—334.
- Grębecki A. 1961: L'enregistrement microphotographique des courants d'eau autour d'un Cilié. Experientia 17, 93—94.
- Grębecki A. 1962a: Phénomènes électrocinétiques dans le galvanotropisme de *Paramecium caudatum*. Bull. Biol. Fr. B. (sous presse).
- Grębecki A. 1962b: Point isoélectrique superficiel et quelques reactions locomotrices chez *Paramecium caudatum*. Protoplasma 56, 80—88.

- Grębecki A. 1963: Galvanotaxie transversale et oblique chez les Ciliés. *Acta Protozool.* 1, 91—98.
- Jahn T. L. 1961: The mechanism of ciliary movement. I. Ciliary reversal and activation by electric current. *J. Protozool.* 8, 369—380.
- Kamada T. 1928: Current strength and anodal galvanotropism in *Paramecium*. *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 2, 29—40.
- Kamada T. 1931: Polar effect of electric current on the ciliary movements of *Paramecium*. *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 2, 299—307.
- Kamada T. 1934: Some observations on potential differences across the ectoplasmic membrane of *Paramecium*. *J. Exp. Biol.* 11, 94—102.
- Kamada T. 1940: Ciliary reversal of *Paramecium*. *Proc. Imp. Acad. Tokyo* 16, 241—247.
- Kinosita H. 1954: Electric potentials and ciliary response in *Opalina*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo* 7, 1—14.
- Ludloff K. 1895: Untersuchungen über den Galvanotropismus. *Pflüger's Archiv* 59, 525—554.
- Mast S. O. and Nadler J. E. 1926: Reversal of ciliary action in *Paramecium caudatum*. *J. Morphol. Physiol.* 43, 105—117.
- Naitoh Y. 1958: Direct current stimulation of *Opalina* with intracellular micro-electrode. *Annot. Zool. Japon.* 31, 59—73.
- Naitoh Y. 1959: Relation between the deformation of the cell membrane and the change in beating direction of cilia in *Opalina*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo* 8, 357—369.
- Oliphant J. F. 1938: The effect of chemicals and temperature on reversal in ciliary action in *Paramecium*. *Physiol. Zoöl.* 11, 19—30.
- Oliphant J. F. 1942: Reversal of ciliary action in *Paramecium* induced by chemicals. *Physiol. Zoöl.* 15, 443—452.
- Shedlovsky T. (Editor) 1955: *Electrochemistry in biology and medicine*. New York & London.
- Statkewitch P. 1904: Galvanotropismus und Galvanotaxis der *Ciliata*. *Z. Allg. Physiol.* 4, 296—332.
- Ueda K. 1961a: Electrical properties of *Opalina*. I. Factors affecting the membrane potential. *Annot. Zool. Japon.* 34, 99—110.
- Ueda K. 1961b: Electrical properties of *Opalina*. II. Factors affecting the membrane resistance. *Annot. Zool. Japon.* 34, 161—179.
- Viaud G. et Bonaventure N. 1956: Recherches expérimentales sur le galvanotropisme des Paramécies. *Bull. Biol. Fr. B.* 90, 287—319.
- Yamaguchi T. 1960: Studies on the modes of ionic behavior across the ectoplasmic membrane of *Paramecium*. I. Electric potential differences measured by the intracellular microelectrode. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo* 8, 573—591.

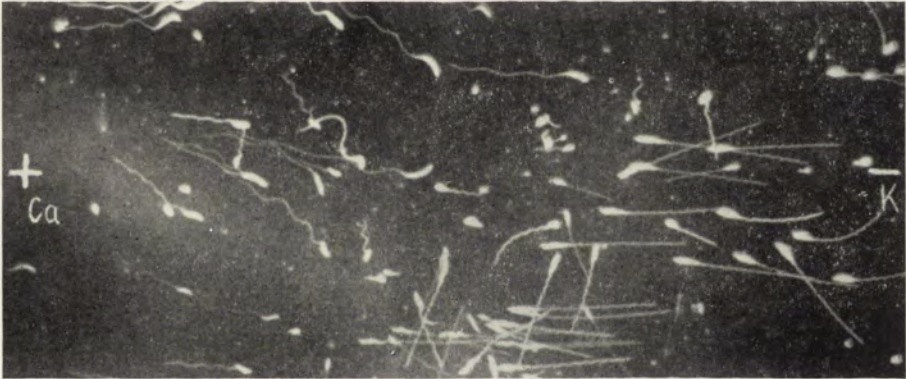
#### EXPLICATION DE LA PLANCHE I

- 1: Galvanotaxie renormalisante dans sa phase anodique, démontrant également une quantité d'individus conservant une position transverse
- 2: Trajets des Paramécies nageant vers le centre de la cuve en présence d'un superflu de ions  $K^+$  près de la cathode et de ions  $Ca^{2+}$  du côté de l'anode
- 3: Trajets des Paramécies nageant vers les extrémités de la cuve en présence d'un superflu de ions  $Ca^{2+}$  du côté de la cathode et ions  $K^+$  près de l'anode  
(Technique d'enregistrement macrophotographique du mouvement des Protistes d'après Dryl 1959)

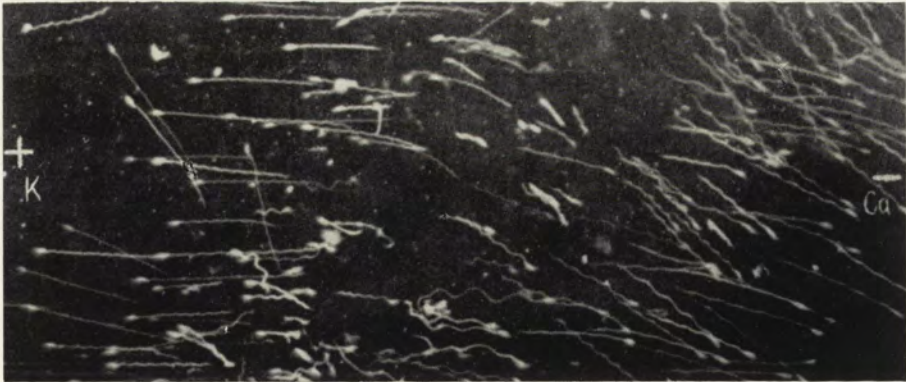




1



2



3

A. Grębecki

auctor phot.



---

Department of General Biology of the M. Nencki Institute of Experimental Biology,  
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Krystyna GOLIŃSKA

## Experimental study on rebounding from a mechanical obstacle in *Paramecium caudatum*

Badania eksperymentalne zjawiska odbicia od przeszkody mechanicznej  
u *Paramecium caudatum*

When a free swimming *Paramecium* touches a mechanical obstacle it responds in two ways: it either avoids the obstacle repeating the avoiding reaction several times (Jennings 1906), or rebounds from it and swims away in another direction. The phenomenon of rebounding was first reported and analyzed by Dembowski 1924. He stated that the angle of rebounding i.e. the angle between the line perpendicular to the surface of the obstacle and the direction line of the ciliate is constant being in average  $70^\circ$  and is independent from the angle of incidence. The cause of constancy of the angle is, according to Dembowski — the excitation of the oral cilia by the touch of the obstacle. The beating of the oral cilia evokes turning to the aboral side of the body and subsequently the ciliate continues its movement in the new direction.

Rebounding can relatively rarely be observed. The authors concerned with this problem stressed that rebounding is easily disturbed by different factors: e.g. action of a high temperature, of ethyl alcohol (Aleksandrov 1948), of high content of  $\text{CO}_2$ , or of bacterial food in the medium (Dembowski 1924, Grębecki, Kinastowski und Kuźnicki 1956).

As a factor of rebounding Dembowski considered the chemical conditions of medium, especially the sufficient degree of aeration. He also found that excitation may influence the behaviour of *Paramecium* at the wall of a vessel, e.g. shaking may evoke the rebound even when oxygen content is too low. Since it was stated that both factors: oxygen and mechanical excitation are accelerating the ciliary movement (Šmagina 1948), a question arises whether rebounding is connected with the velocity of the ciliate movement.

The aim of the present study was to determine whether the value and constancy of the rebounding angle depend on the velocity and character of

the ciliate movement. The preliminary observations of the reversion movement (evoked by potassium salts) revealed that also in this case the angle of rebounding is constant but shows much greater value than in the normal progressive movement.

I wish to express my gratitude to prof. dr. J. Dembowski for suggesting the problem of the present study and to doc. dr. S. Dryl for his help in my research.

#### Material and methods

For experiments a clone of *Paramecium caudatum* Ehrbg. from a pool in Sadyba (environment of Warsaw) cultivated in our laboratory since 1957 was used. Cultures were fed with lettuce infusion inoculated with *Aerobacter aerogenes* following the Sonneborn's 1950 method.

The ciliates were rinsed in phosphate buffer (pH=7) after Dryl 1959a for 30 min prior to the experiment. The observations of rebounding angle were carried out in a square vessel; its walls were the obstacle on the ciliate course. Walls of the vessel were made of coverslips stuck with paraffin to microscopic slides. The edge of the vessel measured 7 mm in length, the layer of medium not exceeding 0.5 mm. In those vessels microscopical observations were made as well as measurements of the rebounding angle using projection technique and registration method as described by Dembowski 1924. The vessel with ciliates was placed on the stage of a lens x10. A projector adjusted underneath the stage gave a light beam which passed through the vessel and the lens. The image was projected upon the calking paper fixed on a glass screen. When tracing the ciliate movement with a pencil on the calking paper, the ciliate course became registered.

Evaluation of the velocity of the ciliate movement was carried out by the photomacrographic method of Dryl 1960. As an obstacle to the movement in the observation of rebounding served a microscopic slide fixed with paraffin to the margin of a glass plate. The velocity of movement was registered on a film and the intensity of rebounding was recorded simultaneously. The value of the rebounding angle and of the movement velocity were calculated as arithmetical means from 100 measurements. The medium for observations of the movement velocity was the 2 mM CaCl<sub>2</sub> solution in distilled water. Other details of method are mentioned in the course of description of the experiments.

#### Microscopical observations of rebounding

The course of rebounding in *Paramecium* was observed in the experimental vessel under a low power lens (up to x120).

When the ciliate meets the obstacle, it slides along it with its whole body length, then swims away turning at a constant angle which is usually different from the angle of incidence. In this way, it first touches the obstacle with its anterior end, then with its antero-lateral surface and, at last, with the postero-lateral side.

The lateral side as well as the oral and aboral may be oriented towards the obstacle. In my observations, the turn to the aboral side occurs rather casually. This observation is also confirmed by the study of conjugating individuals in which the rebound occurs quite normally although one of the conjugants touches the obstacle exclusively by its dorsal side. Behaviour of dividing individuals was also observed. No deviations from the normal course of the process were observed but rebounding in division occurs only in exceptional cases because the dividing individuals are not very motile and, when meeting the wall of the vessel, stop at it for a longer time. Yet a mechanical stimulus by shaking the vessel evokes a regular reaction in all phases of division however for a short time.

#### Influence of the body shape on the value of rebounding angle

The observations of rebounding show that *Paramecium* touches the obstacle with its postero-lateral body surface immediately before having swum away. Consequently the direction of the subsequent course would depend on the value of the apical angle of the cone represented by the posterior part of the ciliate body. To simplify the description of experiments, the rebound-

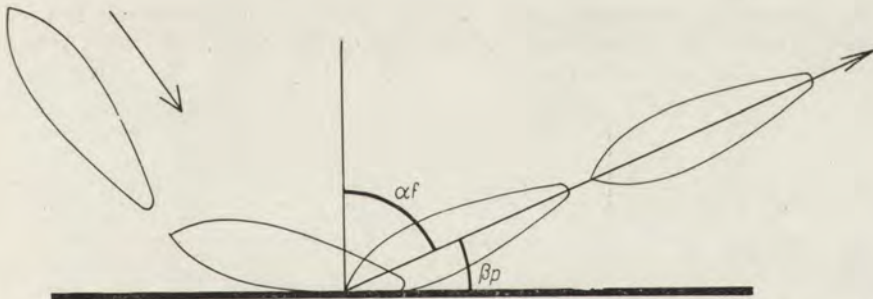


Fig. 1. Scheme of the rebounding phenomenon in *Paramecium* swimming forwards. For more detailed explanation see the text

ing angle of the progressive movement is called conventionally angle  $\alpha_f$ ; angle  $\beta_p$  denotes the angle between the postero-lateral body surface and the long axis of *Paramecium*. Angle  $\beta$  determines also the direction of the ciliate movement (Fig. 1). According to the author's supposition, the angles  $\alpha_f$  and  $\beta_p$  should sum up to  $90^\circ$ .

In a series of experiments for the measurement of the angle  $\alpha_f$  (Tab. 1 measur. 1) *Paramecium* in 2 mM  $\text{CaCl}_2$  solution was studied. As a rule, in this medium rebounding occurs in all the individuals. Then the value of angle  $\beta_p$  was determined by measuring on photographs of *Paramecium* moving in the same solution. The mean value of angle  $\alpha_f$  amounts  $60^\circ$  and of angle  $\beta_p$  —  $28^\circ$ , consequently the sum of the two angles differs only by  $2^\circ$  from the  $90^\circ$  angle.

Table 1  
Dependence of the rebounding angle on direction of ciliary movement  
in *Paramecium caudatum*

Medium	Value of the rebounding angle	Character of movement
2 mM CaCl <sub>2</sub>	$\alpha_f = 60^\circ \pm 6.49^\circ$	normal
2 mM CaCl <sub>2</sub> (Infusoria adapted to 20 mM KCl)	$\alpha_f = 61^\circ \pm 4.92^\circ$	normal
20 mM KCl	$\alpha_b = 76^\circ \pm 4.94^\circ$	reversion
5 mM KCl	$\alpha_t = 60^\circ \pm 5.72^\circ$	slowed

The second series of measurements (Tab. 1 measur. 3) concerned the ciliates swimming backwards in 20 mM KCl solution with addition of Ca<sup>2+</sup> (Oliphant 1938). Rebounding regularly occurs during reversion of the ciliary movement (Dryl unpublished). The measurements of the rebounding angle in reversion ( $\alpha_b$ ) and of the angle formed by the antero-lateral body margin with the long axis of *Paramecium* (angle  $\beta_a$ ) were made similarly as in the first series of experiments. The mean value of the angle  $\alpha_b$  proved to be 76° and of the angle  $\beta_a$  — 11°. The sum of the two angles differed by 3° from 90° (Fig. 2).

The possibility was considered whether some other factors as the velocity of movement or the strength of beating of the peristomal cilia may influence the value and constancy of the rebounding angle. To prove the in-

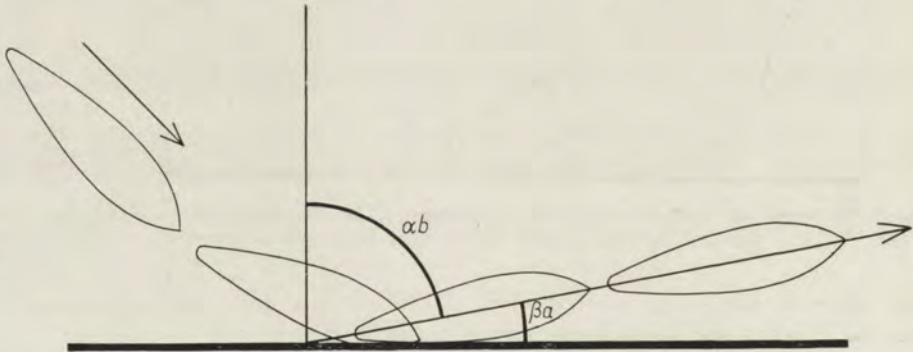


Fig. 2. Scheme of the rebounding phenomenon in *Paramecium* swimming backwards. For more detailed explanation see the text

fluence of the velocity of movement, a series of measurements of the angle  $\alpha_f$  was executed in 5 mM KCl solution with Ca<sup>2+</sup> added in which the ciliate movement is slowed (Tab. 2). When compared with the velocity results in CaCl<sub>2</sub> solution, the fall of velocity is considerable, yet the value of the angle  $\alpha_f$  in KCl solution is the same and amounts about 60° (Tab. 1 meas. 1, 4). Consequently the interrelation between the value and constancy of the rebounding angle and the velocity of movement was not stated.

Another factor to be proved was the influence of beating of the peristomal cilia stimulated by the touch with the wall of the vessel. The peristomal area in this case receives the stimulus and responds to it. The rebounding angle was constant in reversion similarly as in the forward movement, although the peristomal area in reversion was normally not stimulated. A series of experiments was also performed in 2 mM KCl solution with ciliates adapted previously to 20 mM KCl medium. Those ciliates perform a forward movement but are little sensitive to the chemical stimuli of the medium (Dryl 1959b). The measurements revealed that in this case the value of the rebounding angle is not much different from that shown in the results with the normal forward movement.

#### Influence of the movement velocity upon the occurrence of rebounding

The value of the rebounding angle is unaltered when various chemical composition of medium is applied. Yet in some solutions rebounding fails to occur; instead of rebounding the individual approaching the wall of the vessel either swims along it, or stops, turns round, swims backwards, etc. In this case the typical avoiding reaction follows frequently. The first preliminary experiments proved that rebounding fails to occur before all in solutions without  $\text{Ca}^{2+}$ . On the other hand, in rather early studies, the accelerating influence of Ca ions upon the velocity of movement in ciliates was reported (Pantin 1930, Mast and Prosser 1932, Pitts and Mast 1933 — cited after Calkins and Summers 1941). Grębecki i Kuźnicki 1955 observed a rapid movement of *Paramecium* exclusively round the periphery of the medium drop in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Some experiments were carried out to determine the influence of the velocity of movement upon rebounding in *Paramecium*. A gradual fall of velocity was evoked by 3 methods: the fall of temperature (Glaser 1924), increase of viscosity after addition of methyl-cellulose or in different concentrations of KCl (Andrejeva 1931). Rebounding occurred rarely in propor-

Table 2

Occurrence of rebounding in relation to swimming rate  
in *Paramecium caudatum*

##### 1. Influence of temperature

Temperature	Velocity of movement in mm./sec.	Frequency of rebounding
25°	1.200 ± 0.225	mass occurrence
20°	1.184 ± 0.215	mass occurrence
15°	0.828 ± 0.175	mass occurrence
10°	0.604 ± 0.164	frequent
5°	0.318 ± 0.110	no rebounding
0°	0.249 ± 0.100	no rebounding

## 2. Action of methyl-cellulose

Relative viscosity of medium	Velocity of movement in mm./sec.	Frequency of rebounding
1	$1.810 \pm 0.211$	mass occurrence
1.347	$1.024 \pm 0.186$	mass occurrence
1.607	$0.677 \pm 0.169$	frequent
1.932	$0.475 \pm 0.099$	random
2.400	$0.404 \pm 0.085$	no rebounding

## 3. Influence of different KCl concentrations

Concentration of KCl in mM	Velocity of movement in mm./sec.	Frequency of rebounding
1	$1.587 \pm 0.294$	mass occurrence
2	$0.550 \pm 0.294$	mass occurrence
5	$0.596 \pm 0.153$	random
10	$0.486 \pm 0.121$	no rebounding
20	$0.128 \pm 0.103$	no rebounding

tion as the movement became slower, and at a certain limit it failed to occur at all. The individual approaching slowly to the wall of the vessel usually swims backwards, and moves away instead of rebounding. Extinction of rebounding in all 3 series of experiments was always observed at the same velocity of movement i.e. about 0.6—0.7 mm/sec. (Tab. 2). When velocity was below 0.5 mm/sec. rebounding was not observed.

## Discussion

The result of experimental study indicate that in the same conditions of medium, the frequency of rebounding seems to vary with the changes of velocity of the ciliate movement but the constancy and value of the rebounding angle depends on the body shape of the ciliate.

It has been stated that the factors reducing the velocity of movement involve the extinction of rebounding as well. On the contrary the factors accelerating the movement of cilia as mechanical irritation, a rich content of oxygen, presence of  $\text{Ca}^{2+}$  — stimulate rebounding. Consequently the degree of aeration — according to Dembowski the indispensable factor of rebounding — is one of the factors of major importance. This conclusion is supported by observations of Grębecki, Kinastowski und Kuźnicki 1956 concerning the occurrence of rebounding exclusively in the superficial layer of the culture. A clear evidence of correlation of rebounding with the velocity of movement seems to be the extinction of rebounding at the same velocity, with no regard to the nature of the factor which evokes the slowing.

The constancy of the rebounding angle seems to depend on the apical angle of the cone formed by the posterior part of the ciliate body. Measure-



ments of the angles  $\alpha_f$ ,  $\alpha_b$ ,  $\beta_D$  and  $\beta_a$  confirm this theory. The increase of the rebounding angle when *Paramecium* swims backwards is probably induced by the fact that the anterior part of the body which meets the obstacle the last, is much more narrow than the posterior. The somewhat lower value of the angle  $\alpha_f$  and  $\alpha_b$  as compared with those calculated in theory, may be accounted for by the elasticity of the ciliate body which permits of a certain bend when *Paramecium* touches the obstacle. A rather considerable variability of the body shape in *Paramecium* may also be the reason of deviations in the value of the rebounding angle. The variability of shape may also account for the difference of the value of rebounding angle as stated by Dembowski (70°) and the data of the present study (60°).

The role of the peristomal cilia in rebounding is rather insignificant. Some more considerable fluctuations in the angle value in the normal individuals than in the *Paramecia* adapted to KCl — which fail to show the avoiding reaction — seem to indicate a certain importance of the oral cilia since they interfere with the constancy of the rebounding angle. It is not clear however whether the *Paramecia* adapted to KCl and insensitive to chemical stimuli (D r y l 1959b) are insensitive to mechanical stimuli as well. On the other hand, the extinction of rebounding in the case of a low velocity of movement seems to exclude the decisive role of the peristomal cilia in the constancy of rebounding angle. It seems little probable that the peristomal cilia being sensitive to the mechanical factors (i.e. the avoiding reaction when meeting the obstacle) below a certain velocity of movement, became insensitive to direct excitation. Another evidence in favour of the opinion of the minor role played by the oral area in the process of rebounding, may be found in the behaviour of fragments of *Dileptus anser*. In some conditions, those fragments devoid of proboscis and cytostome, rebound in a similar way as *Paramecium* (Doroszewski unpublished).

Rebounding seems to differ essentially from the avoiding reaction not only by the lack of the reversion phase. So it may be assumed that in the case of rebounding we have to do with another type of animal's reaction to the mechanical obstacle. Yet it is difficult to decide in what sense rebounding may be looked upon as a reaction of the organism and not as a purely mechanical rebound of an object from an obstacle.

The correlation of rebounding frequency with velocity and dependence of the relative constancy of the rebounding angle on the body shape — seem to speak in favour of a purely physical basis of this phenomenon.

### Summary

Occurrence of rebounding from a mechanical obstacle in *Paramecium caudatum* depends on the velocity of movement. It usually occurs at velocity of over 0.6—0.7 mm/sec and extincts completely when the movement is below 0.5 mm/sec with no regard to the factor evoking the changes of velocity.

The value of the rebounding angle seems to depend on the shape of the ciliate body, especially on the value of the angle between the body axis and the postero-lateral surface in the forward movement, and between the body axis and the antero-lateral surface in the case of reversion of the ciliary movement.

## STRESZCZENIE

Pojawianie się zjawiska odbicia *Paramecium caudatum* od przeszkody mechanicznej zależy od szybkości ruchu pierwotniaka. Z reguły odbicia występują przy szybkości powyżej 0.6—0.7 mm/sek, natomiast zanikają całkowicie przy szybkości ruchu poniżej 0.5 mm/sek niezależnie od rodzaju czynnika powodującego zmiany prędkości.

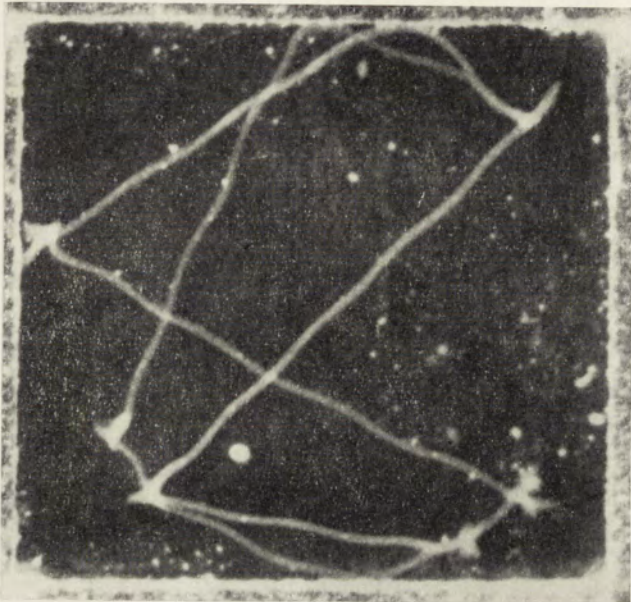
Wielkość kąta odbicia *Paramecium* od przeszkody mechanicznej zdaje się zależeć od kształtu ciała pierwotniaka, a w szczególności od wielkości kąta między osią ciała a tylno-boczną powierzchnią przy ruchu naprzód, i odpowiednio kąta między osią ciała a przednio-boczną powierzchnią przy rewersji ruchu rzęsek.

## REFERENCES

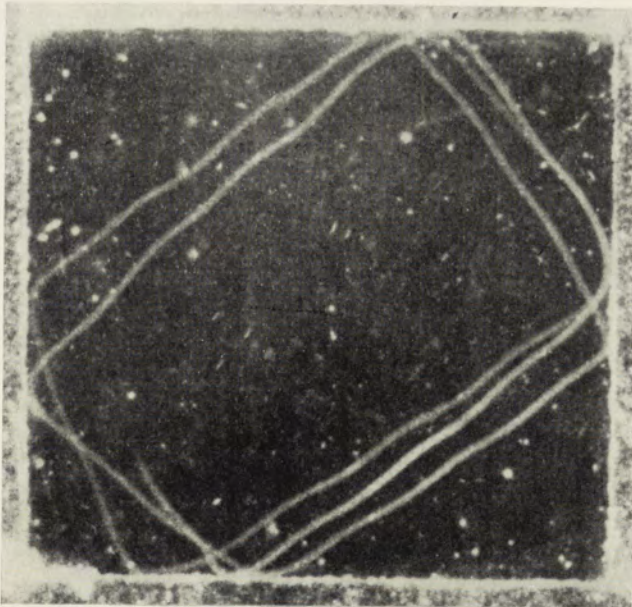
- Aleksandrov V. J. 1948: Metodika izmierenia skorosti dviženja paranecii. Zool. Ž. 27, 461—464.
- Andrejeva E. W. 1931: Zur Frage über die physikalisch-chemische Bestimmung der Korrelationen einiger physiologischer Prozesse bei *Paramecium caudatum*. Arch. Protistenk. 73, 346—360.
- Calkins G. N. and Summers F. M. 1941: Protozoa in Biological Research. New York, Columbia University Press.
- Dembowski J. 1924: Über die Bewegungen von *Paramecium caudatum*. Arch. Protistenk. 47, 25—54.
- Dryl S. 1959a: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. J. Protozool. 66 (suppl.), abstr. 96.
- Dryl S. 1959b: Effects of adaptation to environment on chemotaxis of *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Exp. 19, 83—93.
- Dryl S. 1960: The velocity of forward movement of *Paramecium caudatum* in relation to pH of medium. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Glaser O. 1924: Temperature and forward movement of *Paramecium*. J. Gen. Physiol. 7, 177—185.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1955: Stosunek *Paramecium caudatum* do chemizmu środowiska i ochronny wpływ skupienia wobec substancji nieorganicznych. Folia Biol. 3, 127—157.
- Grębecki A., Kinastowski W. und Kuźnicki L. 1956: Manche Fegelmässigkeiten in dem Raumverhalten von *Paramecium caudatum* Ehrbg. („peripherische Reaktion“). Acta Biol. Exp. 17, 61—69.
- Jennings H. S. 1906: Behaviour of the Lower Organisms. New York, Columbia University Press.
- Oliphant J. F. 1938: The effect of chemicals and temperature on reversal in ciliary action in *Paramecium*. Physiol. Zoöl. 11, 19—30.
- Šmagina A. P. 1948: Mercatelnoje Dviženie. Moskva, Medgiz.
- Sonneborn T. M. 1950: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool. 113, 87—147.

## EXPLANATION OF THE PLATE I

- Photographic registration of movement of *Paramecium* swimming in a square drop
- 1: Avoiding reactions without rebounding  
2: Reboundings without avoiding reaction



1



2

K. Golińska

auctor phot.



Fasciculi praeparati:

Z. Raabe: Systematics of the family *Urceolariidae* Dujardin 1841 [Systematyka rodziny *Urceolariidae* Dujardin 1841] — Z. Raabe: La stomatogenèse chez *Conchophthirus* (*Ciliata*, *Thigmotricha*) [Stomatogeneza u *Conchophthirus* (*Ciliata* *Thigmotricha*)] — M. Wolska: Morphology of the buccal apparatus in *Balantidium coli* (Malmsten, 1857) [Budowa aparatu gębowego u *Balantidium coli* (Malmsten, 1857)] — J. Vávra: Spore projections in *Microsporidia* [Wybężky spor u mikrosporidií] — A. Grębecki and L. Kuźnicki: The influence of external pH on the toxicity of inorganic ions for *Paramecium caudatum* [Wpływ pH środowiska na toksyczność jonów nieorganicznych dla *Paramecium caudatum*] — Ю. И. Полянский: О способности инфузории туфельки (*Paramecium caudatum*) переносить отрицательные температуры [On the capacity of *Paramecium caudatum* to stand the sub-zero temperatures] — L. Kuźnicki: Recovery in *Paramecium caudatum* immobilized by chloral hydrate treatment [Powrót *Paramecium caudatum* do normy po immobilizacji wodzianem chloralu] — M. Doroszewski: Some features of the ciliary activity in *Dileptus* [O pewnych właściwościach ruchu rzęskowego u *Dileptus*] — S. Dryl: Oblique orientation of *Paramecium caudatum* in electric field [Orientacja skośna *Paramecium caudatum* w polu elektrycznym] — W. Kinastowski: Der Einfluss der mechanischen Reize auf die Kontraktilität von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. [Wpływ bodźców mechanicznych na kurczliwość *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.] — W. Kinastowski: Das Problem „des Lernens“ bei *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. [Zagadnienie „uczenia się” u *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.].

Państwowe Wydawnictwo Naukowe  
(PWN — Polish Scientific Publishers)  
Warszawa

Printed in Poland, DRP

## Fasciculi:

1. J. Lom: Discovery of a *Tripartiella* in the urinary tract of *Phoxinus phoxinus* L. [Nález zástupce r. *Tripartiella* v močovém traktu střevli] . . . . . 1
2. A. Czapik: La morphogenèse du Cilié *Cyclidium citrullus* Cohn (*Hymenostomatida*, *Pleuronematina*) [Morfogeneza orzęska *Cyclidium citrullus* Cohn (*Hymenostomatida*, *Pleuronematina*)] . . . . . 5
3. J. Sikora: Study on the parasitic ciliate *Steinella uncinata* (Schultze) [Badania nad pasożytniczym orzęskiem *Steinella uncinata* (Schultze)] . . . . . 13
4. И. Б. Райков: Ядерный аппарат равноресничных инфузорий *Geleia orbis* Fauré-Fremiet и *G. murmanica* Raikov [The nuclear apparatus of the holotrichous ciliates *Geleia orbis* Fauré-Fremiet and *G. murmanica* Raikov] . . . . . 21
5. М. Н. Голикова: Морфологическое и цитохимическое исследование жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis* Stein [Morphological and cytochemical study of the life cycle of *Nyctotherus cordiformis* Stein] . . . . . 31
6. М. Jerka-Dziadosz: Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. [Morfogeneza w podziale i w regeneracji *Urostyla grandis* Ehrbg.] . . . . . 43
7. I. Totwen-Nowakowska: The effect of nutrition on the regeneration of the caudal body fragment in *Paramecium caudatum* [Wpływ odżywiania na regenerację tylnego odcinka ciała *Paramecium caudatum*]. . . . . 55
8. Е. М. Хейсин, Л. П. Овчинникова, Г. Б. Селиванова и Э. Г. Бузе: Изменение количества ДНК в макронуклеусе *Paramecium caudatum* в период от деления до деления [Changes of the DNA content in the macronucleus of *Paramecium caudatum* in the interdivisional period] . . . . . 63
9. М. Brutkowska: Effect of pH on the food vacuole formation in *Paramecium caudatum* [Wpływ pH na tworzenie wodniczka pokarmowego u *Paramecium caudatum*] . . . . . 71
10. J. Lom and J. Vávra: The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores [Způsob vystřelování sporoplasmy u spor mikrosporidií] . . . . . 81
11. A. Grębecki: Galvanotaxie transversale et oblique chez les Ciliés [Galwanotaksja poprzeczna i skośna u orzęsków] . . . . . 91
12. A. Grębecki: Rebroussement ciliaire et galvanotaxie chez *Paramecium caudatum* [Rewersja rzęskowa a galwanotaksja u *Paramecium caudatum*] . . . . . 99
13. K. Golińska: Experimental study on rebounding from a mechanical obstacle in *Paramecium caudatum* [Badania eksperymentalne zjawiska odbicia od przeszkody mechanicznej u *Paramecium caudatum*] . . . . . 113