

# 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: 14 — 24**

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.

Zdzisław RAABE

Systematics of the family *Urceolariidae* Dujardin 1841Systematyka rodziny *Urceolariidae* Dujardin 1841

The study of *Urceolariidae* reaching as far back as the work of O. F. Müller 1780, was really initiated by the descriptions of Ehrenberg 1838 and Stein 1854, and found the proper basis for its development in the excellent synthetic work of Fabre-Domergue 1888 and also in the careful study of Wallengren 1897. Later on, a gape in the research of this group arose and lasted up to the twentieth of the current century. Since that time a great number of papers on *Urceolariidae* have appeared containing also descriptions of new species mostly parasites of skin and gills of fishes.

No doubt, those studies contributed much interesting material to our knowledge of this group and revealed its consistency and variety; on the other hand they introduced much confusion into its image. Descriptions of new species not fully grounded and not sufficiently thought over, or based on a naive analysis of material, the lack of firmly established systematical criteria and of comparable methods of study — created a situation which requires a fundamental comparison of material and some criticism in its evaluation.

After my own study of 26 species of *Urceolariidae*, and after having obtained their plain and comparable morphological picture applying the silver impregnation method of Klein, and after having collected the full — as it seems — bibliography of the subject I may feel myself competent for performing this work. As result, the monograph of *Urceolariidae* is being prepared. But before it appears in print in its definite form I wish to present the systematic scheme suggested for the group *Urceolariidae*. I am inclined to do so realizing that many protozoologists studying this group meet some difficulties in finding the fundamental differences of the generic ranges.

History of the systematics of *Urceolariidae*

The first attempt of systematization of the *Urceolariidae* — precisely the *Peritricha-Mobilia* — was made by Fabre-Domergue 1888. The following classification was suggested:

Urceolaria	{	Corps nu	{	Spire buccale leotrope, pas de cupule striée, <i>Licnophorides</i> . . . . . <i>Licnophora</i> C.		
				{	Spire buccale dextrope; une cupule striée, <i>Trichodinides</i>	
					{	Anneau de soutien lisse
				{	Cercle de cils et cercle de cirrhes . . . . . <i>Leiotrocha</i> F.-Dom.	
				{	Cercle de cils . . . . . <i>Anhymenia</i> F.-Dom.	
				{	Cercle de cils et cercle de cirrhes . . . . . <i>Cyclocyrrha</i> F.-Dom.	
				{	Cercle de cils et un velum . . . . . <i>Trichodina</i> Ehrbg.	
				{	Cercle de cils, peristome atrofié . . . . . <i>Cyclochaeta</i> Jacks.	
					. . . . . <i>Trichodinopsis</i> Cl. et Lachm.	
					. . . . . <i>Trichodinopsis</i> Cl. et Lachm.	

As species known to the author and being in most cases the unic and typical species of established genera, Fabre-Domergue considers and describes: *Licnophora auerbachii* Cohn (= *L. cohni* Clap. = *L. asterisci* Gruber), *Urceolaria mitra* (De Siebold), *Leiotrocha serpularum* Fabre-Domergue, *Anhymenia scorpenae* Robin, *Anhymenia steinii* Clap. et Lachm., *Cyclocyrrha ophiotricis* Fabre-Domergue, *Trichodina bidentata* Fabre-Domergue and *Trichodina pediculus* Müller.

The investigations of subsequent years brought descriptions of many species included before all into the genus *Trichodina* and elucidated the matter of the spurious ciliature of *Trichodinopsis* body, revealed the presence of a crown of the scarce marginal cilia around ciliary girdle of the sucker in the forms included to the genera *Urceolaria*, *Anhymenia* and *Trichodina*, and induced the transfer of *Licnophora* from *Urceolariidae* to another position, rather among *Spirotricha* than *Peritricha*. As result, many subsequent authors left in the group of *Urceolariidae* only two genera: *Trichodina* with the armed skeletal ring and *Urceolaria* with a smooth ring.

Among many authors studying the system of *Urceolariidae* in connection with other problems, this family was a special subject of work of Zick 1928 who tried to introduce some order into its taxonomy. He distinguished 3 genera, namely:

1. *Urceolaria* Stein — „mit Tastcilien und glatten Ring“, with the species: *U. mitra* Siebold, *U. serpularum* Fabre-Domergue, *U. korschelti* Zick;

2. *Trichodina* Ehrenberg — „mit Tastcilien und gezähnten Ring“, with the species: *T. pediculus* Ehrbg., *T. spongillae* (Jackson), *T. scorpenae* Robin, *T. asterisci* Gruber, *T. ophiotricis* Fabre-Domergue, *T. antedonis* (?) Cuénot, *T. domerguei* (Wallengren), *T. labrorum* Chatton;

3. *Acyclochaeta* Zick — „ohne Tastcilien, mit gezähnten Ring“, with the species: *A. sp.* Lieberkühn, *A. Steini* (Clap. Lachm.), *A. baltica* (Quen.), *A. (?) sp.* Rosseter, *A. bidentata* (Fabre-Dom.), *A. patellae* (Cuénot), *A. sp.* Embleton, *A. urinicola* (Fulton).

4. *Trichodinopsis* Clap. Lachm. — with the species *T. paradoxa* Clap. Lachm.

The system of Zick is neither sufficiently thought over nor substantiated. The existence or absence of hooks or "Tastcilien" is arbitrarily and with no ground attributed or denied in different species e.g. he denies the "Tastcilien" in *U. patellae* Cuénot, and describes hooks in this species although just reverse is true. "*Trichodina antedonis* Cuénot included here belongs to

another group: it is — as shown by Chatton et Lwoff 1949 — *Hemispeira*.

Fauré-Fremiet 1943 found right to leave only two genera with two sub-genera each, according to the following scheme:

The links of the skeletal ring smooth:	genus <i>Urceolaria</i> Stein
no cirri . . . . .	subgenus <i>Urceolaria</i> Stein
with a crown of cirri . . . . .	subgenus <i>Leiotrocha</i> Fabre-Dom.
The links of the skeletal ring with hooks:	genus <i>Trichodina</i> Ehrbg.
no cirri . . . . .	subgenus <i>Trichodina</i> Ehrbg.
with a crown of cirri . . . . .	subgenus <i>Cyclochaeta</i> Jackson

Fauré-Fremiet stated that "le velum des Trichodines est ainsi homologue au cercle de cirres des *Leiotrocha* et de *Cyclochaeta*, alors qu'il est formé d'un mince repli cuticulaire et protoplasmatique plus ou moins développé d'une espèce à l'autre". In consequence, Fauré-Fremiet concludes that e.g. *Urceolaria korschelti* Zick should bear the name *Leiotrocha korschelti* instead of *Cyclochaeta korschelti* as is advocated by Kahl 1935, because it differs from *U. mitra* or *Trichodinopsis paradoxa* by the presence of cirri. *Cyclochaeta domerguei* Wall. should be called *Trichodina domerguei* because its difference — concerning the cirri — from *T. pediculus* or *T. steini* is less significant than from *Cyclochaeta spongillae* or *C. ophiotricis*.

The scheme of Fauré-Fremiet is a progress in systematization of material. Yet it omits many essential characters of single species: the structure of the adoral spiral (its length and extend), distinction of such a form as *Trichodinopsis paradoxa* Clap. Lachm. or *Polycycla discophora* Poljansky (described later) or species included into the genera *Trichodinella* Šramek-Hušek, *Dipartiella* G. Stein (= *Dogielina* Raabe), *Semitrichodina* Kazubski or *Vauchomia* Mueller. Since the validity of such a character as the presence or lack of cirri is objected by many authors, the key of Fauré-Fremiet is based exclusively on the structure of the links of the skeletal ring.

New and valuable taxonomic elements are contributed by the works of Lom 1958, 1959, 1960, indicating the importance of the structure of the skeletal ring and of the adoral spiral and also of "cirri" and of velum. Lom suggested the following taxonomic scheme of *Urceolariidae*:

1. Denticulate ring of the adhesive disc consists of smooth elements
  - A. Body is of conical form, peristome, vestibulum, and cytopharynx reveal a structure different from that of other species . . . . .
    - g. *Trichodinopsis* Clap. et Lachm., 1862
  - B. Body shows a different shape, adoral region and peristome are of ordinary type . . . . .
    - g. *Urceolaria* Stein, 1867
  - a. There appears a ring of strong, long, erected marginal cilia . . . . .
    - subg. *Leiotrocha* (Fabre-Dom., 1888)
  - b. So far as the cilia exist they are not so well developed . . . . .
    - subg. *Urceolaria* (Stein, 1867)
2. Denticulate ring consists of denticles with two projections — distal blade and proximal ray
  - A. Adoral region in form of arch up to 180° . . . . .
    - g. *Trichodinella* (Raabe, 1950)
  - B. Adoral region performs a spiral of at least one complete turn . . . . .
    - g. *Trichodina* Ehrbg, 1830
  - a. Adoral region performs less than two turns . . . . .
    - I. with a ring of strong, long, erected marginal cilia . . . . .
      - subg. *Cyclochaeta* (Jackson, 1875)

- II. the cilia are little distinct or absent . . . . . subg. *Trichodina* (Ehrbg., 1830)  
 b. Adoral region performs a spiral with 2—3 turns . . . . . subg. *Vauchomia* (Mueller, 1938)

In his paper from 1959 Lom distinguished 4 subgenera in the genus *Trichodinella*, namely: *Trichodinella* s. str., *Foliella* Lom 1959, *Tripartiella* Lom 1959 and *Dogielina* Raabe 1959; he also supports the genus *Semitrichodina* Kazubski 1958. In his discussion on *Trichodina* of the bladder of *Amphibia*, Lom 1958, 1960 eventually suggests to maintain the subgenus *Acyclochaeta* Zick 1928 for *Trichodina urinicola* Fulton, 1931 and other species with no marginal cilia around the ciliary girdle.

No doubt, the system of Lom 1958 is the most right and justified, illustrating in the best way the similitudes and differences of the family *Urceolariidae* representatives, being based on numerous most recent researchwork — before all of the Polish and Czechoslovak authors. Yet it is not free from some defects involved — among other reasons — by the not sufficiently exact analysis of the described species of the genera: *Cyclochaeta*, *Urceolaria* and *Leiotrocha* (presence or lack of cirri), and also — in my opinion — by the not correct evaluation of the rank of some characters. Another inconvenience of the system is also letting remain too many unities of the subgenus rank which makes the system not sufficiently clear and involves difficulties of a taxonomic and nomenclatoric nature.

### Principles of the suggested system

In search of a systematic scheme for *Urceolariidae* which should truly reflect their affinities without affecting clearness, it is obviously necessary to reach to a few characters. They should be characters of a high systematic value indicating the phylogenetic relationship of species, giving reason for grouping them into genera. As far as possible they should be evolutionary characters and their changes ought to reflect the evolutionary tendencies of the whole group. Such fundamental and essential characters seem to be: the properties of the adoral spiral and of the skeletal ring.

The most distinguishing element in *Urceolariidae* is the general aspect of the skeletal ring namely: its composition of smooth links encroaching one upon another in a tilelike system, or of funnel-shaped links inserted one in another, with centrifugal hooks and centripetal spikes. Although Fauré-Fremiet et Thureauux 1944 connect both types of links as well in ontogeny as in phylogeny which would indicate their common origin, their structure however is plainly different which suggests different ways of their evolution. And indeed, the further paths of evolution and the complex of taxonomic characters in the two groups bearing the two types of skeletal system, seem to be independent one from another and even slightly divergent. This involves the necessity of treating those groups as separate systematic unities.

As consequence, in accordance with the natural relations, I find it possible and correct to separate two subfamilies within the family *Urceolariidae* Dujardin: subfamilia *Urceolariinae* subf. nova with a smooth skeletal ring, and subfamilia *Trichodininae* subf. nova with the skeletal ring bearing centrifugal

hooks, or hooks and centripetal spikes. In both subfamilies, the essential characters which may serve as systematic criteria combine and coincide in a slightly different manner.

In *Urceolariinae*, the adoral spiral is always full i.e. it describes a circle or, rather more than a circle (about  $400^\circ$ ) around the apical pool. The difference concerns its size: it may be approximately equal to the diameter of the

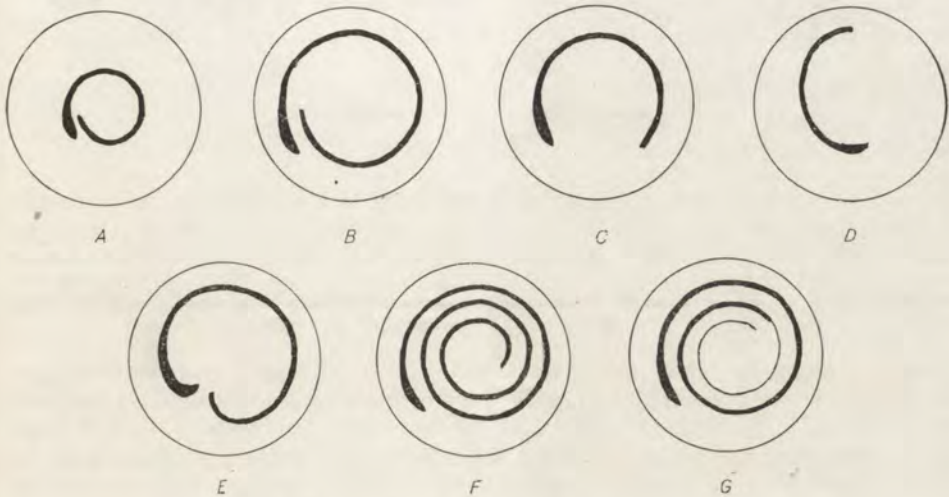


Fig. 1. Types of adoral spiral in *Urceolariidae*:

A — full spiral with a short radius (*Trichodinopsis*, *Polycycla*), B — full spiral with a long radius (*Trichodina*, *Urceolaria*), C — incomplete spiral (*Tripartiella*, *Trichodinella*), D — much reduced spiral (*Semitrichodina*), E — cardioid spiral (*Poljanskina*, *Urc. mitra*), F — multiple spiral (*Vauchomia*), G — partly reduced multiple spiral (*Paravauchomia*).

adhesive disk and then the organism has a nearly cylindrical shape, or the radius may be much — even by half — shorter which results in a conical shape of the body. There is a plain convergence of those dissimilarities and of the difference in the number of links of the skeletal ring, the latter being about 20 in the species with an extensive spiral, and about 50 in the species with a small spiral. Those joint criteria allow to differentiate 2 pairs of genera in *Urceolariinae*. The genera of each pair differ from each other by the character of their nuclear apparatus as also by other properties. Those genera are:

<i>Urceolaria</i> Lamarck 1801, Stein 1867	(with 4 species described),
<i>Leiotrocha</i> Fabre-Domergue 1888	(with 5 species described),
<i>Trichodinopsis</i> Clap. Lachm. 1862	(with 1 species described),
<i>Polycycla</i> Poljansky 1951	(with 2 species described).

*Urceolariinae* are exclusively parasites of invertebrates, the first two living on integument, the two other in the intestine of the host.

In *Trichodininae* as well the adoral spiral as the structure of the skeletal ring show more variety than in the other subfamily. The adoral spiral describes always an arc with a radius approximately as long as the radius of the adhesive disc. As to its extension, several variants may occur: 1. the full spi-

ral describes an arc of approx.  $400^\circ$  (with a variant of a cardioid spiral), 2 the spiral reduced to an arc of  $180^\circ$ — $270^\circ$  or even to  $90^\circ$ — $180^\circ$ , 3. the multiple spiral describing twice or three times the full arc, 4. the same multiple spiral with a reduced centripetal part.



Fig. 2. Types of links of skeletal ring in *Urceolariidae*:

A — links with hooks and spikes (*Trichodina*), B — the same links much encroaching one upon another (*Vauchomia*), C — links with weak spikes (*Tripartiella*), D — links without hooks with well developed trunk (*Trichodinella*), E — links without hooks with weak trunk (*Dipartiella*), F — scarce smooth links (*Urceolaria*, *Leiotrocha*), G — dense smooth links (*Polycycla*, *Trichodinopsis*)

As to the character of the skeletal ring, four variations may be distinguished. They are represented by four groups of genera: 1. links of the ring with strong hooks and spikes, 2. links with strong hooks but weak spikes, 3. links with hooks but no spikes and with well developed trunks, 4. links with no spikes and with highly reduced trunks. The number of links may also be an important feature. Combination of all those variants of both characters allows to distinguish 8 genera. Their diversity is also confirmed by other characters. Those genera are:

<i>Trichodinella</i> Šramek-Hušek 1953	(with 8 described species),
<i>Dipartiella</i> G. Stein 1961	(with 1 described species),
<i>Tripartiella</i> Lom 1960	(with 7 described species),
<i>Semitrichodina</i> Kazubski 1958	(with 2 described species),
<i>Trichodina</i> Ehrenberg 1838	(over 70 described species),
<i>Poljanskina</i> gen. novum	(with 1 described species),
<i>Vauchomia</i> Mueller 1938	(with 2 described species),
<i>Paravauchomia</i> gen. novum	(with 1 described species).

The most disproportionally extensive genus *Trichodina* Ehrbg. comprising over 2/3 of all known species of *Urceolariidae* shows a great uniformity of its fundamental features: the adoral spiral describing an arc of  $350^\circ$ — $450^\circ$ , with an even circular outline, the skeletal ring of links with strong hooks and spikes. The only criteria — as it seems — permitting for division of this genus might be the differences in construction of the adoral ciliary ring around the adhesive disc but — before all — the absence or a strong development of the marginal cilia (so called cirri). In the present state of knowledge, the possibility of isolation of 3 subgenera might be signalized at the most: *Trichodina* s. str. with a ring of marginal cilia poorly developed, *Acyclochaeta* Zick 1928 with no marginal cilia, and *Cyclocyrrha* Fabre-Domergue 1888 with exceptionally strong marginal cilia resembling to cirri (species from *Echinodermata*?).



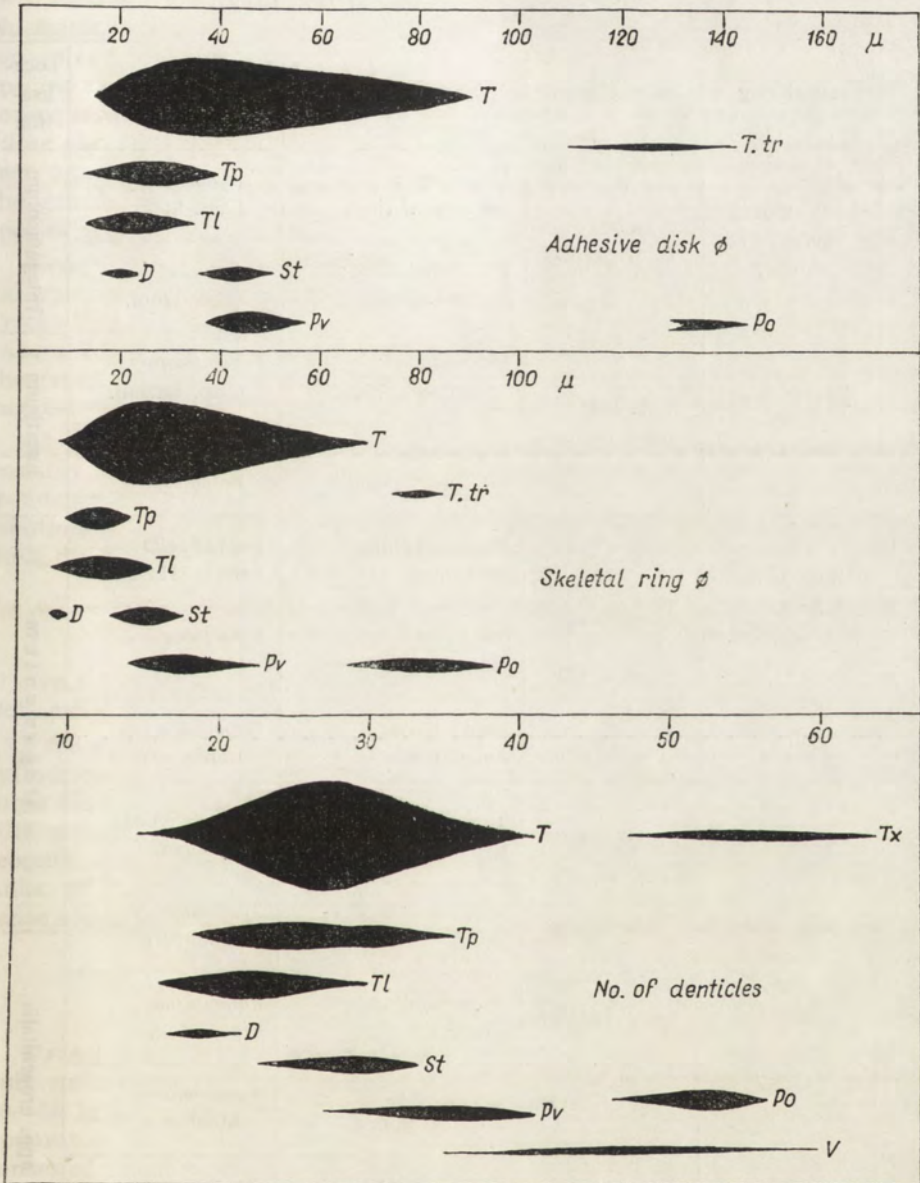


Fig. 3. Frequency of taxonomic characters (adhesive disc diameter, skeletal ring diameter and number of denticles) in genera of the fam. *Urceolariidae*

T — *Trichodina*, T. tr — *Trichodina truttae*, T. x — *Trichodina xenopodos*, Tp — *Tripartiella*, Tl — *Trichodinella*, D — *Dipartiella*, St — *Semitrichodina*, Pv — *Paravauchomia*, V — *Vauchomia*, Po — *Poljanskina*

Table 1  
Survey of the proposed systematics of *Urceolariidae*

Sub-fam.	Skeletal ring	Adoral spiral	Other characters	Genus	Localisation
<i>Urceolariinae</i> subf. n.	links smooth av. 20 in number	ca 360° great radius	Ma simple; no cortical rings	<i>Urceolaria</i> Lam. Stein	integumentum
			Ma complicated; cortical rings	<i>Leiotrocha</i> Fabre-Dom.	
	links smooth av. 50 in number	ca 360° small radius	Ma compact; "pharyngeal gland"	<i>Trichodinopsis</i> Clap. Lachm.	intestinum
			Ma bandlike; no "phar. gland"	<i>Polycycla</i> Poljansky	
<i>Trichodininae</i> subf. nova	links with hooks, without spikes	reduced to an arc 180°—270°	trunks of links developed	<i>Trichodinella</i> Šram. Hušek	integumentum
			trunks of links reduced	<i>Dipartiella</i> G. Stein	
	hooks strong, spikes feeble	<i>Tripartiella</i> Lom			
	100°—180°	hooks and spikes strong	<i>Semitrichodina</i> Kazubski		
	links with hooks and spikes	360°—450°	hooks and spikes strong	<i>Trichodina</i> Ehrenberg	app. urogenitalis
		360°, cardioid	hooks and spikes strong	<i>Poljanskina</i> gen. nov.	
		2—3 × 360°	adoral spiral fully developed	<i>Vauchomia</i> Mueller	
			adoral spiral partly reduced	<i>Paravauchomia</i> gen. nov.	

In the systematic scheme presented above, the genus *Cyclochaeta* Jackson 1875 has disappeared. The "cirri" which are its characteristic feature occur also in other genera as marginal cilia and are not its distinctive element. Ano-

ther character linking *C. spongillae* Jackson, 1875 and *C. scorpenae* Robin, 1879 should have been the atrophy of the oral apparatus and of adoral cilia. No doubt, the origin of those data is the wrong interpretation of erroneously recognized structures. Presumably *Cyclochaeta scorpenae* Robin is the same species as "*Anhymenia*" *scorpenae* described by Fabre-Domergue 1888, consequently it is a species of the genus *Trichodina* Ehrbg. *Cyclochaeta spongillae* should be recognized as a species inquirenda since it has never been seen again after Jackson's signalization. It obviously is a representative of the genus *Trichodina*. At any rate there is no good reason to keep for this species the genus *Cyclochaeta*.

Genus *Anhymenia* Fabre-Domergue disappears as well, because its typical species *A. steini* Clap. et Lachm., 1858 truly corresponds to the genus *Trichodina* Ehrbg. The genera *Cyclocyrrha* Fabre-Domergue 1888 and *Acyclochaeta* Zick 1928 might be (as mentioned above) considered as subgenera of the genus *Trichodina* Ehrbg. The systematic scheme of the family *Urceolariidae* suggested above is represented in the Table 1.

The diagnosis of the family, subfamilies and genera are given which may possibly be helpful in ranking the collected and studied material and in introducing corrections and additions. The species belonging to a genus are not mentioned because a mere enumeration would not be useful and giving their diagnoses would go beyond the scope of this communication.

#### Familia *Urceolariidae* Dujardin 1841

syn.: *Trichodinidae* auctorum, *Trichodinopsidae* Kent 1882, *Polycyclidae* Poljansky 1951, *Leiotrochidae* Johnston 1938.

Free swimming *Peritricha*, telotrochoidal in all stages of life. Body shape cylindrical, barrel-shaped, or conoidal. Adoral spiral mostly full (ca 400°), in some case reduced or polycyclic (90° — 3×360°). The aboral complex zone of cilia occurs constantly and surrounds the adhesive slide disc homologous to scopula. Adhesive disc strengthened by the skeletal ring, composed of smooth links, or links, with centripetal and centrifugal appendices. In the ecological sense external and internal parasites of numerous animal groups.

#### Subfamilia *Urceolariinae* subf. n.

*Urceolariidae* with a skeletal ring composed of smooth links without hooks and spikes. Body cylindrical, barrel-shaped or conoidal. Skeletal ring of 20—50 links. Adoral spiral full (ca 400°) with a long or short radius. Nuclear apparatus of a various shape. External or internal parasites (in ecological sense) of invertebrates.

Type genus: *Urceolaria* Lamarck 1801 — Stein 1867.

Genus *Urceolaria* Lamarck 1801 — Stein 1867

syn.: *Trichodina* pro parte auctorum.

*Urceolariidae*, *Urceolariinae* with cylindrical body, flattened in various degree. Adoral spiral describing an arc over 360° (ca 400°) with a large radius

similar to the radius of the adhesive disc. Links of the skeletal ring smooth with neither hooks nor spikes, encroaching one upon another in a tilelike manner, their number being about 20 (14—22). Macronucleus compact or horseshoe-shaped. Ectoparasites of fresh water and marine invertebrates.

Type of the genus: *Urceolaria mitra* von Siebold, 1850.

Genus *Leiotrocha* Fabre-Domergue 1888

*Urceolariidae*, *Urceolariinae* with cylindrical body, somewhat barrel-shaped. The adoral spiral circulary, describing an arc of  $400^\circ$  with the radius of the same length as the radius of the adhesive disc. Macronucleus of a complex structure composed of a central part and two lateral arms of a various shape. Links of the skeletal ring smooth, their number — about 20 (12—25). Circular lines round the body. Conjugation occurs between plainly different partners. Parasites of gills and respiratory surfaces (intestine?) of marine invertebrates.

Type of the genus: *Leiotrocha serpularum* Fabre-Domergue, 1888. According to Raabe 1960 rather *Leiotrocha patellae* (Cuénot, 1891).

Genus *Trichodinopsis* Claparède et Lachmann 1862

syn.: *Urceolaria* pro parte auctorum.

*Urceolariidae*, *Urceolariinae* with cone-shaped body; the apical part occupied by the adoral spiral describing an arc of ca  $400^\circ$ , its radius much shorter than that of the adhesive disc. Links of the skeletal ring smooth, their number of the range of 50. Macronucleus compact. A glandlike swelling of the pharynx occurs. Body wall with circular furrows; often symbiosis with *Spirochaetae*. Intestine parasites of *Gastropoda*.

Type of the genus: *Trichodinopsis paradoxa* Claparède et Lachmann, 1862.

Genus *Polycycla* Poljansky 1951, emend.

*Urceolariidae*, *Urceolariinae*, with cone-shaped body, a small adoral spiral composed of smooth links (their number of the range of 50). Macronucleus ribbonlike L-shaped, no glandlike swelling of the pharynx (?). On the body wall distinct circular furrows. Often symbiosis with *Spirochaetae*. Intestine parasites of *Holothurioidea*.

Type of the genus: *Polycycla discophora* Poljansky, 1951.

I include this genus — like Corliss 1954 did — to *Urceolariidae*, because its distinction concerns the same features which are characteristic for *Trichodinopsis*. Poljansky points out the circular ciliature of his *Polyclada discophora* but — no doubt — he means the "pseudociliature" composed of *Spirochaetae* as it occurs in *Trichodinopsis*. It should be reminded that in *Trichodinopsis paradoxa* a full ciliature of the whole body was described and the role of *Spirochaetae* was elucidated only by Fauré-Fremiet 1909 and by Cepède et Willem 1911. I do not hesitate to include *Urceolaria synaptae* Cuénot, 1891 — Cosmovici, 1913 to the genus *Polycycla*. Similitude of those forms suggests supposition that they represent the same species.

#### Subfamilia *Trichodininae* subf. n.

*Urceolariidae* with a skeletal ring composed of links with centrifugal hooks or with hooks and centripetal spikes. Body cylindrical or barrel-shaped, sometimes slightly conical. Adoral spiral variably developed, full, re-

duced to an arc  $90^{\circ}$ — $340^{\circ}$ , or multiple ( $2 - 3 \times 360^{\circ}$ ), with a long radius similar to the radius of the adhesive disc. Macronucleus mostly sausage-shaped sometimes compact. In ecological sense external and internal parasites of vertebrates and invertebrates.

Type genus: *Trichodina* Ehrenberg 1838.

Genus *Trichodinella* Šramek-Hušek 1953

syn.: *Trichodina* pro parte — Mueller 1937, 1938, Dogiel 1940, 1948, Davis 1947; *Brachyspira* Raabe 1950 hom.; *Foliella* Lom 1959.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with adoral spiral reduced to an arc  $180^{\circ}$ — $270^{\circ}$ . Links of the skeletal ring with straight centrifugal hooks, centripetal spikes are fully reduced. Trunk of the link usually well developed. Number of links about 20 (16—30). Gill parasites of fishes.

Type of the genus: *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950).

Genus *Dipartiella* G. Stein 1961

syn.: *Dogielina* Raabe 1959 hom.: *Trichodinella* (*Dogielina*) Lom 1959 — subgenus.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* of small size, adoral spiral reduced to ca  $270^{\circ}$ . Trunk of the skeletal ring links not well developed, with straight centrifugal hooks. Number of links 16—20. Gill parasites of fishes.

Type of the genus: *Dipartiella simplex* (Raabe, 1959).

Genus *Tripartiella* Lom 1959

syn.: *Trichodina* pro parte Davis 1947, Dogiel 1940; *Trichodinella* (*Tripartiella*) Lom 1959 — subgenus.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with the adoral spiral describing an arc of  $180^{\circ}$ — $270^{\circ}$ . Links of skeletal ring (16—30) well developed, hooks generally straight and weak, spikes thin. Macronucleus horseshoe-shaped. Parasites of gills and urinary bladder of fishes.

Type of the genus: *Tripartiella copiosa* Lom, 1959.

Genus *Semitrichodina* Kazubski 1958

syn.: *Trichodinella* pro parte Lom 1958.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with an adoral spiral strikingly short, describing an arc of  $100^{\circ}$ — $180^{\circ}$  and oriented not quite parallel to the margin of the body. Links of the skeletal ring with strong centripetal spikes and also centrifugal hooks resembling to that in *Trichodina*. Parasites of the mantle cavity of land *Gastropoda*.

Type of the genus: *Semitrichodina sphaeronuclea* (Lom 1956).

Genus *Trichodina* Ehrenberg 1838

syn.: *Cyclochaeta* Jackson 1875 et auct.; *Cyclocyrrha* Fabre-Domergue 1888; *Acyclochaeta* Zick 1928.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* of big or moderate size, with cylindrical mostly flattened body. Adoral spiral describing an arc of  $330^{\circ}$ — $450^{\circ}$ , in most cases about  $400^{\circ}$ , with a long radius similar to that of the adhesive disc. Links of the skeletal ring (usually 15—40)<sup>1</sup> have a strong trunks, strongly curved

<sup>1</sup> A deviation presents only *T. xenopodos* Fantham, 1924 with its number of links amounting 46—64.

centrifugal hooks and distinct centripetal spikes. Macronucleus mostly sausage-shaped. Parasites of skin, gills and of urinary bladder of fishes, amphibians and of integument of invertebrates.

Type of the genus: *Trichodina pediculus* O. F. Müller, 1786; Ehrenberg, 1838.

Genus *Poljanskina* genus novum

syn.: *Trichodina* pro parte Poljansky 1951.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with a full but cardioidal adoral spiral. Links of the skeletal ring (about 50) conspicuously encroaching one upon another, with straight hooks and sharp, straight spikes. Parasites of the urinary and genital system of fishes.

Type of the genus: *Poljanskina oviducti* (Poljansky, 1951).

I do not hesitate to isolate as separate genus the species *Trichodina oviducti* Poljansky, 1951, described from the urinary bladder and of oviducts of *Raja radiata*. This species — as follows from the author's description — differs from other representatives of the genus *Trichodina* in its size and in the number of links in the skeletal ring. The diameter of the adhesive disc is up to 145  $\mu$  whereas in other representatives of genus *Trichodina* it reaches scarcely 90  $\mu$  (*T. truttae* Mueller with the diameter of 142  $\mu$  is an exception). The diameter of the skeletal ring measures 65—95  $\mu$  and in other species of *Trichodina* up to 69  $\mu$  (in *T. truttae* — up to 84  $\mu$ ). Number of links amounts 46—56 i.e. is of a range occurring in *Vauchomia* and *Trichodina xenopodos* Fantham, 1924, in other *Trichodina* — not exceeding 39. The character of links resembles rather to that in *Vauchomia* than in *Trichodina*. Finally the study of G. A. Stein convinced me to treat *T. oviducti* as a separate genus. G. A. Stein, co-worker of Poljansky, kindly showed me her illustrations and preparations proving that the adoral spiral in *T. oviducti* has a form of a cardioide and not of a circle as generally occurring in *Trichodinidae*. The cardioidal spiral occurs only in some *Urceolaria* e.g. *U. mitra* v. Siebold. For distinguishing the genus *Poljanskina* I take into account all those characters. The generic name is stressing the great merits of L. G. Poljansky also in his study of *Urceolariidae*.

Genus *Vauchomia* Mueller 1938

syn.: *Cyclochaeta* pro parte Mueller 1931; *Trichodina* pro parte Mueller 1932 et auct.; *Trichodina* p.p. — Dogiel 1940, Lom 1960.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with a distinctly evolutive adoral spiral, describing  $2\frac{1}{2}$ —3 turns. Body usually high hemispherical or slightly conical. Links of the skeletal ring in the number 36—60, strongly encroaching one upon another, with straight centrifugal hooks and centripetal spikes. Macronucleus horseshoe-shaped. Parasites of the urinary bladder of fishes.

Type of the genus: *Vauchomia nephritica* (Mueller, 1938).

Genus *Paravauchomia* genus novum

syn.: *Trichodina* pro parte auctorum.

*Urceolariidae*, *Trichodininae* with the adoral spiral describing several turns, its paracentral part is reduced to a line without kinetosomes. Body is vaulted. Skeletal ring with strong hooks and spikes, number of its segments is 27—50. Macronucleus horseshoe-shaped. Parasites of urinary bladder of fishes.

Type of the genus: *Paravauchomia urinaria* (Dogiel, 1940) — Lom, 1960.

In my opinion, establishing a new genus for *Trichodina urinaria* Dogiel, 1940 parasite of urinary bladder of *Perca fluviatilis*, described again by Lom 1960 — is right and justified. As it follows from Lom's description and from my examination of his preparations which were kindly shown to me, in this species the adoral spiral describes  $1\frac{1}{2}$  turn as a full ciliary structure, continuing to the center of the adhesive disc as a line with no kinetosomes. Lom 1960 considers it as a remainder of the former *Vauchomia* type of spiral. Sharing his opinion, I think that the characteristic aspect of the spiral is of a secondary character and not of a primary as it is in *Trichodina*. Links of the skeletal ring in *Trichodina urinaria* approach rather the type occurring in *Vauchomia*.

### Evolutionary trends in *Urceolariidae*

*Urceolariidae* present a coherent and — as it seems — monophyletic group of *Peritricha*. The distinguishing feature of this family is before all the presence of the adhesive-sliding disc which arose from scopula, and is surrounded by a ring of cilia, homological to the aboral ciliary ring of telotroches in *Peritricha-Sessilia*. So it may be stated in accordance with Fauré-Fremiet that *Urceolariidae* are *Peritricha* telotrochoid for all their life.

However the development of *Urceolariidae* from their hypothetical ancestors followed two paths which I tried to characterize by forming two subfamilies: *Urceolariinae* and *Trichodininae*. Those two groups differ each from another before all in the structure of the skeletal ring and its links; although homological, those structures cannot be ranged into one evolutionary series linking both subfamilies.

Fauré-Fremiet et Thureauux 1944 put forward a very interesting theory on the morphogenesis of the links of skeletal ring in *Urceolariidae* asserting that links of the *Trichodina* type begin their development from the anlagen of the *Urceolaria* type. This had to suggest that the development of *Trichodina* links was a continuation, and consequently a further evolution, of the more primitive *Urceolaria* type of links. Even if this theory is accepted, the derivation of a common initial form should be assumed, considering the *Urceolaria* type of links as more plesiomorphic than the rather apomorphic link of *Trichodina* type.

As systems characterizing by their changes the evolutionary trends in *Urceolariidae*, before all the skeletal ring, the adoral spiral, the surface body structures, fibrillar systems, nucleus and specific organs should be recognized. Changes in those systems of structures characterize the developmental trends in both subfamilies being however different and following not parallel courses in each of them.

In *Urceolariinae* remains as their characteristic and presumably plesiomorphic feature, the lack of hooks and spikes in the skeletal ring. This ring is composed either of a minor number of links (about 20) bearing external humps in their anterior parts (*Urceolaria*, *Leiotrocha*), or the links are more numerous (about 50), smooth and firmly joined (*Polycycla*, *Trichodinopsis*). The representatives of the subfamily *Urceolariinae* are also characterized by a strong development of fibrillar systems, supporting or contractile (*Trichodinopsis*).

*Urceolaria mitra*, *Leiotrocha*). In some species of this subfamily a structure remains, presumably a plesiomorphic feature, occurring in many *Peritricha-Sessilia* namely the presence of circular fibres girdling the body (Raabe 1959). The same structure occurs in *Leiotrocha patellae* (Cuénot) and probably in other related species, but surely fails to occur in *Urceolaria mitra* Siebold and possibly in other species included into the genus *Urceolaria* in this review. This rather primitive feature is not accompanied by other primitive characters, e.g. the nuclear apparatus in the representatives of the genus *Leiotrocha* is highly complex. It seems that presence of circular furrows around the body in *Polycycla* and *Trichodinopsis* is in some way connected with the striation and perhaps even caused by it; in the furrows occurs the location of *Spirochaetae*.

The representatives of genera *Urceolaria* and *Leiotrocha* keep their cylindrical shape of body which might be considered as a primary character, depending on the more or less similar diameter of the full adoral spiral (ca 400°) and of the adhesive disc. In some species with a high body, a characteristic oblique orientation of the body towards the sucker appears; then the adoral spiral assumes the shape of a cardioid (*U. scoloplontis* Precht, *U. mitra* Siebold). In those forms the skeletal ring consists of 12—27 links, being in this way of the range of 20. I am inclined to consider this number as a primitive since it occurs also in numerous *Trichodininae*. Those are parasites of the integument of animals especially of the respiratory organs of invertebrates.

A group of species included into the genera *Trichodinopsis* and *Polycycla* differ distinctly from this type of structure. They are endoparasites of *Holothurioidea*. Certainly, the adaptive development of this group is expressed in the distinct reduction of the diameter of the adoral spiral when related to the diameter of the adhesive disc (which involves the changes of the cylindrical body shape to conical) and also the increase of number of links in the skeletal ring up to a value ranging to 50. The reduction of the adoral apparatus range may be accounted for by some more favorable edaphic conditions, and perhaps by symbiosis with *Spirochaetae* or with bacteria from the pharyngeal gland. The increase of number of links in the skeletal ring is, no doubt, in connection with the plasticity of the sucker which may cover more efficiently areas of the intestine wall of the host. It seems essential that the increase of number of skeletal ring links concerns also the endo-pharyngeal gland. The increase of number of links in the skeletal ring is, genera *Vauchomia* and *Poljanskina*.

In the subfamily *Trichodininae* which is much richer in genera and species, as a initial form of the adoral spiral, that with an arc over 360° (400°) should certainly be recognized, as occurring in the genus *Trichodina* and in the representatives of the subfamily *Urceolariinae* and in majority of *Peritricha-Sessilia*. The spiral covers here the apical body surface by a circle of a diameter equal to that of the sucker. The forms with a full adoral spiral i.e. very numerous species of *Trichodina*, have the skeletal ring composed of links inserting one into another, with strong hooks and distinct centripetal spikes. I am inclined to consider this form of the skeletal ring as initial and fundamental in the subfamily *Trichodininae*.



From this form, the evolution of the adoral spiral in *Trichodininae* seems to proceed into two opposite directions: towards the spiral reduced to an arc of  $180^{\circ}$ — $270^{\circ}$  or even  $100^{\circ}$  and towards the multiple spiral describing up to 3 turns. The reduced spiral occurs in species included by myself and L o m to the genera *Trichodinella*, *Dipartiella*, *Tripartiella* and *Semitrichodina*. Except *Semitrichodina* they all are gill parasites occurring sometimes together with the species of the genus *Trichodina*. So the medium of life fails to account for the reduction of the adoral apparatus.

I put previously forward a supposition (R a a b e 1950) that this reduction may be connected with the limitation of food uptake through the peristome and that those ciliates begin gradually to feed through the surface of the adhesive disc. This problem requires a further study; at any rate reduction of the adoral spiral, not occurring in any other forms of *Peritricha* is very significant.

Reduction of the adoral spiral is accompanied by changes in the structure of the skeletal ring. As a rule, it is somewhat less developed: in the species of genus *Tripartiella* the centripetal spikes are weak and in the representatives of genus *Trichodinella* they fail to occur; the trunk of links is also slightly reduced. The most reduced links occur in *Dipartiella*. It seems that the reduction of centripetal spikes, the simplified structure of links and also the reduction of the adoral spiral are connected with the diminished body size; *Trichodinella* sp. sp. and before all *Dipartiella* are the smallest of the known species in *Urceolariidae*.

The only deviation from this regularity presents the genus *Semitrichodina*. Its links of the skeletal ring (of the *Trichodina* type) are well developed whereas its adoral spiral is extremely reduced. This genus seems to be a lateral evolutionary branch of *Trichodininae*, closely related to *Trichodina* and probably derived from it (J. et Z. R a a b e 1961).

Another diametrically opposite direction of evolution is represented by the genus *Vauchomia* with the multiple (2—3 times) turns of the adoral spiral. Such a multiplicity occurs sometimes in the evolutionary paths of *Peritricha*: representatives of the genus *Campanella* Goldfuss have even a five-fold spiral. No doubt, multiplication of the spiral intensifies propulsion of food with the whirl of water; it occurs exclusively in species living in urinary bladder of fishes where food is scarce. This factor of medium influenced the course of evolution. Nevertheless it should be stressed that multiplication of the spiral concerns not all the bladder parasites, comprising many representatives of genus *Trichodina* with a normal spiral and even those of *Tripartiella* with a reduced spiral.

An interesting case is represented by *Paravauchomia* in which a secondary reduction of the multiple adoral spiral occurred; the active spiral describes here  $1\frac{1}{2}$  of the turn but its paracentral part is lengthened by a full turn of a fibril without kinetosomes. *Paravauchomia* is also a bladder parasite.

The tendency to multiply the number of links in the skeletal ring is in *Vauchomia* a characteristic fact. In *Trichodina*, this number fluctuates between 15 and 40, with the highest frequency 25—26 whereas in *V. nephritica* Mueller it amounts 36—40, and in *V. renicola* (Mueller) — about 56. A similarly high number of links is in *Poljanskina oviducti* (Poljansky) from the urinary bladder and genital ducts of *Raja* (45—57 links), and also in *Trichodina xeno-*

*podos* Fantham from the bladder of *Xenopus* (48—64 links). Unfortunately there are no data on the adoral spiral in the latter species. At any rate it seems characteristic that — like in *Urceolariinae* — the endoparasitic forms show a tendency to the increased number of links in the adoral spiral.

How does the present review reflect the phylogenetic relations within the family *Urceolariidae*? Evidently any effort in this subject should be looked upon as an attempt, the more so as the family *Urceolariidae* is not representing such plain evolutionary paths as e.g. the order *Thigmotricha* in the approach of Chatton et Lwoff 1949.

In the Fig. 4 I tried to picture the hypothetical phylogenetic relations in the form of a traditionally tree. The horizontal plain of the scheme should image the crossing of the presumptive phylogenetic tree with the picture of

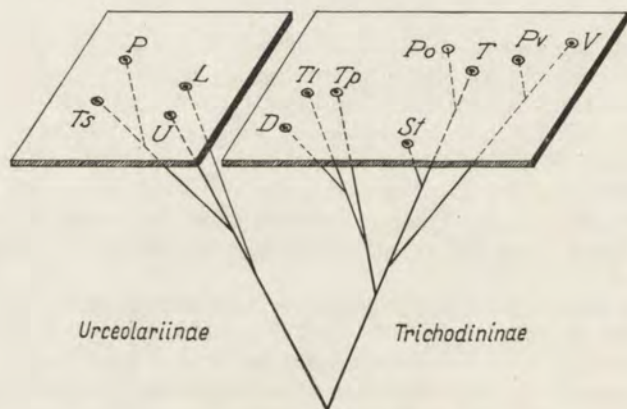


Fig. 4. Phylogenetic diagram of *Urceolariidae*.

P — *Polycycla*, Ts — *Trichodinopsis*, L — *Leiotrocha*, U — *Urceolaria*; among *Trichodininae* — as in Fig. 3

the present state and, consequently, represent the actual state of this group, expressed in mutual relations of genera. The plain of the present state had to be divided into two parts in the scheme, because the elements proving the near and remote affinity of genera are in both subfamilies different. In *Urceolariinae* those elements are: numerosity of links of the skeletal ring and length of the diameter of the adoral spiral; in *Trichodininae* — numerosity of links and length of the adoral spiral arc. When studying this scheme, confronting it with the taxonomic table of the family *Urceolariidae* is necessary (table 1).

### Summary

A taxonomic system suggested for the family *Urceolariidae* (*Ciliata-Peritricha*) based on selected systematical criteria of a phylogenetic value is presented with diagnoses of genera. Two subfamilies have been isolated: *Urceolariinae* subf.n. and *Trichodininae* subf.n. as well as two new genera: *Paravauchomia* g.n. for *Trichodina urinaria* Dogiel, and *Poljanskina* g.n. for *T. oviducti* Poljansky.

## STRESZCZENIE

W oparciu o wybrane kryteria systematyczne o walorze filogenetycznym przedstawiono proponowany układ systematyczny w obrębie rodziny *Urceolariidae* (*Ciliata-Peritricha*) oraz diagnozy poszczególnych jej rodzajów. Wyodrębniono dwie podrodziny: *Urceolariinae* subf.n. i *Trichodininae* subf.n. oraz dwa nowe rodzaje, a mianowicie: *Paravauchomia* g.n. dla *Trichodina urinaria* Dogiel, oraz *Poljanskina* g.n. dla *T. oviducti* Poljansky.

## REFERENCES

- Cepède C. et Villem V. 1911: Observations sur *Trichodinopsis paradoxa*. Bull. Sci. France et Belg., 45, 239—248.
- Chatton E. et Lwoff A. 1949: Recherches sur les ciliés Thigmatriches. I. Arch. Zool. exp. gén. 86, 169—253.
- Corliss J. O. 1961: The Ciliated Protozoa. Intern. Series of Monographs, Zool., 7. Pergamon Press.
- Cosmovici N. S. 1913: Contribution à l'étude de l'*Urceolaria synaptae* Cuénot. Mém. Soc. Zool. France 26, 190—196.
- Dogiel V. A. 1940: K voprosu o sistematike roda *Trichodina*. Trudy Leningr. Obsč. Estestvoispyt. 68, 8—31.
- Dujardin F. 1841: Histoire naturelle des Zoophytes, Infusoires etc. Paris.
- Fabre-Domergue P. R. 1888: Étude sur l'organisation des Urcéolaires et sur quelques genres d'infusoires voisins de cette famille. J. Anat. Physiol. 23, 214—260.
- Fantham H. B. 1924: Some parasitic Protozoa found in South Africa, VII. South Africa J. Sci. 21, 435.
- Fauré-Fremiet E. 1909: Sur un cas de symbiose présenté par un Infusoire cilié. C. R. Soc. Biol. 57, 113—115.
- Fauré-Fremiet E. 1943: Étude biométrique de quelques trichodines. Bull. Soc. Zool. France 68, 158—169.
- Fauré-Fremiet E. et Thureauaux J. 1944: Protéines de structure et cytosquelette chez les urcéolaires. Bull. Biol. France Belg. 78, 143—156.
- Jackson W. H. 1875: On a new peritrichous infusorian (*Cyclochaeta spongillae*). Quart. J. Sci., 15, 243.
- Johnston T. H. 1938: Parasitic Infusoria from Macquarie Island. Antarct. Exped. 1911-1914 Sci. Reports, Series C 1, 1—12.
- Kahl A. 1935: Urtiere oder Protozoa. Die Tierwelt Deutschlands, Teil 30.
- Kazubski S. L. 1958: *Semitrichodina* gen. nov. *sphaeronuclea* (Lom, 1956) — (*Peritricha* — *Urceolariidae*) in *Schistophallus orientalis* Cless. (*Pulmonata* — *Zonitidae*) in Poland. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 6, 109—112.
- Kent W. S. 1882: A manual of the Infusoria. I—III. London.
- Lom J. 1958: A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics. J. Protozool. 5, 251—263.
- Lom J. 1959: On the systematics of the genus *Trichodinella* Šramek-Husek (= *Brachyspira* Raabe). Acta Parasit. Pol. 7, 573—590.
- Lom J. 1960: On two endozoic trichodinids, *Trichodina urinaria* Dogiel, 1940 and *Trichodina polycirra* sp.n. Acta Parasit. Pol. 8, 169—180.
- Mueller J. F. 1938: A new species of *Trichodina* (*Ciliata*) from the urinary tract of the muskalange, with a separation of the genus. J. Parasit. 24, 251—258.
- Poljansky G. I. 1951: O nekotorych paraziticheskih infusorijah iz morskijh molluskov i goloturii. Parasit. Sbornik Zool. Inst. A. N. SSSR 13, 355—370.
- Poljansky G. I. 1955: Materialy po parazitologii ryb severnyh morej SSSR. Trudy Zool. Inst. A. N. SSSR 19, 5—170.

- Raabe J. and Raabe Z. 1961: *Urceolariidae* from fresh-water and terrestrial molluscs in Poland. Acta Parasit. Pol. 9, 141—152.
- Raabe Z. 1959: *Trichodina pediculus* (O. F. Müller, 1786) Ehrenberg, 1838 et *Trichodina domerguei* (Wallengren, 1897). Acta Parasit. Pol. 7, 189—202.
- Raabe Z. 1959: *Urceolariidae* of gills of *Gobiidae* and *Cottidae* from Baltic Sea. Acta Parasit. Pol. 7, 441—452.
- Raabe Z. 1960: On the unknown cortical structure in *Urceolaria*. Acta Parasit. Pol. 9, 153—160.
- Robin 1879: Mémoires sur la structure et la reproduction de quelques infusoires... J. Anat. Physiol. 15, 529.
- Stein F. 1867: Der Organismus der Infusionsthier. II. Leipzig.
- Stein G. A. 1961: K sistematičke *Urceolariidae* (*Infusoria* — *Peritricha*). Zool. Žurn. 40, 1137—1142.
- Zick K. 1928: *Urceolaria korschelti* n.sp., eine neue marine Urceolarine, nebst einen Ueberblick über die Urceolarinen. Z. Wiss. Zool. 132, 355—403.

Zdzisław RAABE

La stomatogenèse chez *Conchophthirus* (Ciliata, *Thigmotricha*)Stomatogeneza u *Conchophthirus* (Ciliata, *Thigmotricha*)

La stomatogenèse des Ciliés et particulièrement la formation et la métamorphose des systèmes ciliaires adoraux intéressent de plus en plus les protozoologues. A part l'intérêt présenté par le problème en soi, l'examen des ressemblances et des différences observées dans les stomatogenèses des Ciliés peut servir d'argument dans des discussions phylogénétiques et systématiques et il est en effet utilisé dans ce but.

Dernièrement, notre attention fut attirée par les thèses de Corliss 1956 et 1960 basées sur des thèses plus anciennes de Fauré-Fremiet 1950, concernant l'appareil adoral des *Hymenostomata-Tetrahymenina*. L'appareil adoral — tetrahymenium — est composé dans ce groupe d'une longue pseudo-membranelle (UM), qui s'étend parallèlement aux cinéties de la ciliature générale, et de trois membranelles (AZM) disposées obliquement envers elle. Corliss, constatant une ressemblance des structures apparaissant, entre autres, dans la stomatogenèse des *Thigmotricha*, en déduit que cet ordre provient de *Tetrahymenina* (via *Pleuronematina*).

La genèse des cinéties adoraux des *Thigmotricha* fut examinée jusqu'à présent précisément par Chatton et Lwoff 1936 dans le cas de *Proboveria loripedis* Chatton et Lwoff. Chez ce Cilié la spirale adorale est fortement écartée en arrière quoique ce déplacement ne soit pas si extrême que chez *Hemispeira* et *Boveria*, tandis que la bouche, comme chez la majorité des *Hemispeiridae*, est située près du pôle postérieur du corps.

La spirale adorale, composée des cinéties 1 et A + B + C, passe pendant la période de la scission vers le front, prenant une position caractéristique pour *Ancistrum* ou *Ancistrumina* (Raabe 1959), c'est-à-dire une position phylogénétiquement initiale pour *Proboveria*. Mais ce n'est que la cinétie stomatogène 1 qui subit une division avec les cinéties de la ciliature générale. La cinétie A + B + C semble tomber totalement en partage au proter, tandis que chez l'opisthe elle se forme par un processus compliqué de cette partie de la cinétie stomatogène 1, qui lui provient, c'est-à-dire de la cinétie 1\*. La cinétie 1\* donne en effet naissance dans la région antérieure à la polycinétie A\*, et plus loin — aux polycinéties G, H et I, de même qu'à la polycinétie K laissée sans nom par Chatton et Lwoff 1936, parallèles l'une à l'autre et disposées obliquement par rapport aux cinéties de la ciliature générale et à la cinétie 1. La polycinétie G donne ensuite B\*, H donne F\* (dont le sort

subséquent n'est pas encore élucidé) et I donne C\* (voir fig. IV chez Chatton et Lwoff 1936)<sup>1</sup>.

Par conséquent dans la région tombant en partage à l'opisthe il y a quatre éléments qui s'y forment de la cinétie stomatogène 1 (ou cinq, si on compte A\*). En effet, ces éléments ressemblent aux membranelles de l'AZM, apparaissant chez *Tetrahymenidae* au nombre de trois. Par la réduction de certains précisée par Chatton et Lwoff 1936 dans le cas de *Probo-*

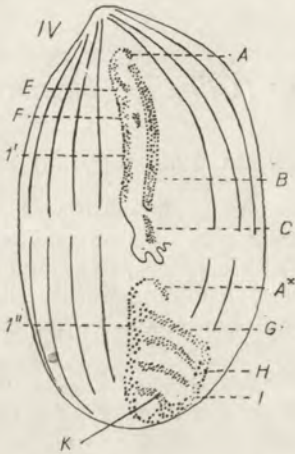


Fig. 1. La stomatogénèse chez *Proboveria loripedis* Ch. Lw. (d'après Chatton et Lwoff 1936, fig. IV — lettre K introduite par l'auteur du travail présent).

nes d'elles et par l'arrangement des autres la cinétie prostomienne A + B + C se forme. Si on peut inférer des dessins de Chatton et Lwoff 1936, probablement dans le corps du proter il y a une continuation de la cinétie A + B + C, quoique même ici on voit se former les cinéties D, E et F, correspondant aux G, H et I de l'opisthe. Le problème de la reconstruction de l'appareil adoral du proter exige donc encore une explication supplémentaire.

\*

Pendant mes recherches j'avais affaire aux divers stades de la scission, et donc de la stomatogénèse, chez quelques représentants du genre *Conchophthirus* Stein, en particulier chez *C. unionis* Raabe et *C. curtus* Englm. de *Unio* sp. sp. (Raabe 1933, 1934). Malgré un matériel plutôt abondant, je n'ai pu malheureusement trouver tous les stades consécutifs de la stomatogénèse. En admettant que la stomatogénèse chez l'opisthe, dès l'apparition des premiers éléments jusqu'à la formation définitive des cinéties adorales, comprend cinq stades, mon matériel ne contenait que trois stades: I, III et V. Il en manquait deux: le II et le IV. J'employais la technique d'imprégnation argentique à sec de B. Klein, qui permet d'apercevoir, à part les cinétosomes, les autres éléments du système ciliaire.

<sup>1</sup> Il faut remarquer, que Chatton et Lwoff 1949, en reproduisant les dessins de Chatton et Lwoff 1936, ont omis la figure IV, la seule qui montrait cette polycinétie additionnelle, appelée par moi K. Il est donc devenu facile pour les auteurs suivants de mettre en homologie le système buccal de *Proboveria* et le tetrahymenium.

La zone nue peristomale est située chez le *Conchophthirus* trophique dans la partie antérieure du corps, près de son bord ventral et est légèrement déviée vers la droite. Elle a la forme d'un triangle aigu dont la base est dirigée en avant et l'angle aigu en arrière. Un pli revêtu d'une dense ciliature générale se penche au dessus de la base de ce triangle. Deux cinéties prostomiennes, parallèles une à l'autre, au contour ressemblant à une pipe, longent le côté droit du triangle (côté gauche de l'observateur). La cinétie intérieure peut être désignée, par analogie au *Proboveria* — comme A + B + C, et celle de l'extérieur — comme cinétie 1. Les cinéties de la ciliature générale (cinétie 2 à droite et cinétie n à gauche du bord ventral du corps) entourent de deux côtés le champ peristomal et convergent en arrière. Une autre cinétie, un peu plus courte prend naissance dans la partie postérieure de la zone péristomale. Elle paraît présenter une continuation génétique de la cinétie 1 (je la désigne en l'appelant 1a). A côté d'elle, dès la courbure postérieure de la cinétie prostomienne 1, l'argyronème s descend vers l'arrière du corps et pénètre entre les cinéties 2 et n de la ciliature générale.

Contrairement au cas de l'*Ancistrum* ou de l'*Ancistrumina*, dont la ligne de scission passe à travers les longues cinéties prostomiennes, la scission du *Conchophthirus* passe visiblement derrière le champ peristomal, hérité entièrement par le proter. L'appareil buccal de l'opisthe se forme tout à fait à nouveau, quoique il entre en relation et en jonction avec les éléments accompagnant l'appareil buccal du parent (R a a b e 1934).

La stomatogenèse de l'opisthe commence dans la partie postérieure du corps du parent, entre ses cinéties 2 et n, la cinétie 1a et l'argyronème s jouant ici clairement un rôle formatif. Leurs éléments terminaux forment une bande qui est ramifiée latéralement soit légèrement soit d'une façon plus distincte. Les cinéties voisines (2 et n) s'éloignent alors l'une de l'autre, libérant un espace fusiforme — le champ organisateur. Je désigne ce stade comme stade I. Les cinéties de la ciliature générale ne s'interrompent pas encore à cette époque à la ligne de scission du Cilié.

Mes préparations n'étaient malheureusement pas assez nombreuses pour démontrer le stade suivant c'est-à-dire le stade II, auquel il fallait s'attendre à l'apparition des structures obliques correspondant par exemple aux éléments G, H et I, décrits par Chatton et Lwoff. Tenant compte du grand nombre d'individus passant le stade I dans toutes les populations des *Conchophthirus* en état de scission, et au nombre également assez important d'individus fixés au stade III, on peut conclure que le stade II, en comparaison aux autres stades, dure très peu et que les transformations qui le caractérisent sont très rapides. Il est à remarquer que Chatton et Lwoff 1936 ne trouvèrent également pas d'illustration suffisante de ce stade, situé entre leurs dessins III et IV!

Les préparations suivantes obtenues en nombre plus important, représentent déjà le stade appelé par moi le stade III. Quatre bandes de cinétosomes, sous forme de stries apparaissent dans le champ organisateur peristomal de l'opisthe. Elles sont obliques par rapport aux cinéties somatiques, et parallèles entre elles. Elles ressemblent parfaitement et sont clairement homologues aux éléments G, H, et I, décrits par Chatton et Lwoff et à l'élément auquel ils n'ont pas donné de nom et que j'ai désigné par la lettre K. D'ailleurs je n'ai pas constaté la présence d'un élément correspondant à l'élément A\*.

Il faut avouer que ces éléments correspondent également bien aux bases ou éventuellement aux structures initiales des bases des membranes obliques (AZM) dans le tetrahymenium chez *Tetrahymenidae* où elles apparaissent toujours au nombre de trois. Au stade III les cinéties de la ciliature générale sont déjà interrompues à la moitié du corps du Cilié, quoique il soit possible que ce phénomène ait lieu déjà au stade II qui nous manque.

Une nette multiplication des cinétosomes se produit au stade III dans la partie antérieure du corps des proter et opiste futurs, ce qui correspond à une réduction relative de la densité de leur répartition dans les parties postérieures

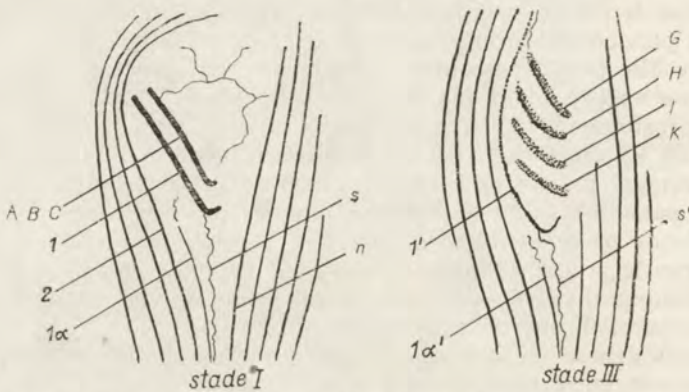


Fig. 2. La stomatogenèse chez *Conchophthirus unionis* Raabe  
 1 — cinétie stomatogène du parent; 1 $\alpha$  — continuation de la cinétie stomatogène 1; s — argyronème s du parent; 2 et n — cinéties de la ciliature générale; ABC — cinétie adorale du parent; 1' — nouvelle cinétie stomatogène chez l'opisthe; 1 $\alpha$ ' — nouvelle continuation de la cinétie 1'; s' — nouvelle argyronème s; G, H, I, K — polycinéties de l'AZM chez l'opisthe

res du corps des deux individus filiaux. En même temps, chez le proter quelques cinéties s'interrompent en formant à leurs bouts l'orifice d'une nouvelle vacuole pulsatile; l'ancienne reste chez l'opisthe.

Le stade II manquant, je ne peux pas déterminer exactement la source et la manière de la formation des éléments G, H, I et K, ce qui serait d'une importance essentielle. Ils semblent se former du complexe: cinétie  $\alpha$  + argyronème s, car ils conservent une liaison topographique avec ces structures et souvent même une connection par l'intermédiaire des argyronèmes. Je ne peux pas exclure la participation des cinéties voisines de la ciliature générale dans leur formation, notamment des cinéties n, n-1, n-2, prenant en considération des nombreuses préparations montrant que ces cinéties se terminent (comptant de l'arrière) au voisinage des bouts postérieurs des éléments G et H, de temps en temps de J et parfois de K, et qu'elles sont également liées à eux par des argyronèmes. Néanmoins la comparaison avec le cours de la stomatogenèse des autres Ciliés, rend cette interprétation très peu probable. Je crois plutôt qu'il s'agit dans ce cas d'une rétraction des cinéties vers l'arrière du corps de l'opisthe.



Le stade suivant, que j'appellerai stade IV, n'apparaît pas non plus sur mes préparations. De nouveau on pourrait juger qu'il englobe un processus rapide et expliquer ainsi sa fréquence restreinte dans le matériel. Les images du stade III avancé et du début du stade V permettent de suggérer que la cinétie 1a restante donne en se courbant d'une façon adéquate, la cinétie prostomienne 1 (peut être aussi avec la participation de l'élément K) et qu'une nouvelle cinétie — 1a<sup>1</sup> se différencie. A côté d'elle et souvent en contact direct, une nouvelle argyronème s<sup>1</sup> passe vers l'arrière du corps de l'opisthe.

Je ne pouvais pas suivre exactement la formation de la deuxième cinétie prostomienne, c'est-à-dire de la nouvelle cinétie A + B + C. La domination de l'élément G permet de supposer que c'est justement lui qui la forme, probablement avec la participation des éléments H et I qui disparaissent à cette époque, mais je n'ai pas de preuves directes confirmant cette opinion.

Ces transformations aboutissent au stade de nouveau bien représenté dans mon matériel; je le détermine par le nom de stade V. Les deux cinéties prostomiennes acquièrent déjà à ce stade leur forme de pipe, la cinétie 2 et les suivantes se courbent vers le bord ventral au dessus du champ péristomal, les cinéties n, n-1 et souvent les suivantes, restent interrompues sans contact avec celles du proter.

Pendant la période des grands changements et des processus formatifs au peristome de l'opisthe, celui du proter ne subit que des transformations relativement faibles. Contrairement au *Proboveria* ni la cinétie A + B + C du proter, ni même la cinétie 1 ne contribuent nullement aux phénomènes qui se produisent chez l'opisthe. Néanmoins, certains changements du peristome de l'opisthe sont visibles déjà pendant la scission; ils se manifestent avant tout par un effacement partiel du contour des deux cinéties prostomiennes. Sur quelques préparations j'ai vu une image suggérant la formation d'éléments obliques, correspondant peut-être aux éléments E et F de *Proboveria* décrits dans les travaux de Chatton et Lwoff. Mais, en tout cas, tout semble indiquer que le peristome du parent, hérité par le proter, est inactif pendant le cours de la scission; probablement donc ses cinéties subissent alors une différenciation suivie par une réorganisation.

Des transformations homologues à ceux que Chatton et Lwoff constatèrent chez *Proboveria*, peuvent donc être révélées pendant la stomatogenèse de l'opisthe chez *Conchophthirus*. Il semble que c'est la continuation de la cinétie stomatogène 1 (1" chez Chatton et Lwoff, 1a chez moi) ou d'un élément détaché d'elle, qui constitue dans les deux cas l'agent formatif du système adoral de l'opisthe. Dans les deux cas au champ organisateur du peristome de l'opisthe, apparaissent quatre éléments obliques par rapport à la cinétie 1 et par rapport aux autres cinéties de la ciliature générale, mais parallèles l'un à l'autre; ils correspondent, sans aucun doute à l'AZM. Une partie de ces éléments donne naissance, dans les deux cas, à la cinétie prostomienne B + C (dans mon cas je ne peux rien dire concernant le secteur A) tandis que les autres disparaissent.

De même que chez *Proboveria* (?), la stomatogenèse du proter chez *Conchophthirus* est beaucoup plus simple et en effet elle se réduit à la transformation des anciennes cinéties 1 et A + B + C en cinéties nouvelles, du même caractère (Les dessins de Chatton et Lwoff 1936 n'indiquent pas clairement, si la cinétie A + B + C subsiste, ou si elle disparaît, remplacée par

une nouvelle cinétie, formée par la cinétie stomatogène sous la forme de D, E et F).

Cette similitude est d'autant plus intéressante que chez les deux espèces et les deux genres: *Proboveria* et *Conchophthirus*, le péristome du parent se trouve dans une situation entièrement différente. Chez *Proboveria* il est situé dans la région qui va appartenir à l'opisthe, il semble donc qu'il "pourrait être" transmis directement, et que seule le péristome du proter "doit être" formé à nouveau. Chez *Conchophthirus*, au contraire, il est situé dans la région tombant en partage au proter, donc il semble évident qu'il doive être formé à nouveau chez l'opisthe.

La conformité des phénomènes morphogénétiques, subsistant malgré les importantes différences morphologiques et topographiques, démontre clairement la parenté des deux espèces, deux genres, et par conséquence, même des deux familles qu'ils représentent: *Hemispeiridae* et *Conchophthiridae*, mettant ainsi en évidence la descendance de ces familles des mêmes formes ancestrales. Il semble qu'il faudrait chercher ces ancêtres communs parmi les *Pleuronematidae*.

On peut donc admettre qu'au moins dans deux familles de *Thigmotricha*: *Hemispeiridae* et *Conchophthiridae*, durant la morphogenèse de l'appareil adoral, à côté de la cinétie stomatogène 1 correspondant à l'UM, apparaissent au moins quatre éléments portant le caractère de l'AZM (les cinéties G, H, I et K). Mais ces éléments se réduisent et se transforment ultérieurement, de telle manière qu'il ne reste qu'une cinétie adorale A + B + C ou B + C, simple ou composée de segments.

Si on considère ces stades de l'ontogenèse en tant qu'étapes d'une récapitulation, indiquant que chez des formes ancestrales il existait un système de l'AZM déterminé et conservé à l'état trophique, il faut, par conséquence, s'attendre à ce que ce système renferme au moins quatre éléments, et non trois présents à l'état définitif et dans le développement typique du tetrahymenium (par exemple chez *Tetrahymenidae*).

Chez *Hymenostomata-Tetrahymenina* comme le prouve l'étude de plusieurs espèces, le système surnommé tetrahymenium (1 UM + 3 AZM) est présent non seulement aux stades trophiques, mais exactement le même système apparaît dans le champ organisateur durant l'ontogenèse (surtout pendant la formation de novo de l'appareil adoral de l'opisthe).

Je suis donc d'avis, que les stomatogenèses de *Tetrahymenina* et de *Thigmotricha* examinées sous cet égard doivent être considérées comme homologues dans leur plan général. En effet, l'homologie des cinéties 1 et de l'UM de même que l'homologie de A + B + C et de l'AZM, sans doute rend les deux groupes homologues. Cette homologie indique l'existence de presources communes dans les transformations subites par les deux groupes, mais — à mon avis — elle ne peut servir d'argument ni en faveur de la reconnaissance de la primitivité générale du „tetrahymenium”, ni pour prétendre que le groupe *Tetrahymenina* soit ancestrale non seulement pour *Thigmotricha*, comme le soutient Corliss 1960 suivant Faure-Fremiet 1950, mais même pour les *Peritricha*.

On se rend souvent aux recherches de Chatton et Lwoff 1936 sur *Proboveria* en cherchant un argument en faveur de la thèse postulant que les *Thigmotricha* proviennent des *Tetrahymenina*. L'erreur consiste dans le

fait que les auteurs précédents n'ont pas pris en considération et en calcul et n'ont pas dénommé le quatrième élément (appelé par moi K). Ils l'avaient pourtant une fois dessiné, mais ce stade fut ensuite omis dans les publications ultérieures de L w o f f.

Il semble, par conséquence, que pendant les stomatogenèses des *Thigmotricha* apparaissent des structures qui sont homologues aux éléments de tetrahymenium tout en ne leur étant pas identiques, ce qui ne montre pas que la descendance des *Thigmotricha* de *Tetrahymenina* soit une conclusion nécessaire. Il semble probable après l'examen plus précis de la stomatogenèse des autres groupes que le principe de l'homologie générale de ces structures est encore plus large englobant encore plusieurs formes. Mais il semble aussi, que cette homologie considérée exactement selon les principes de la loi biogénétique, ne peut pas décider du problème de la descendance d'un groupe de l'autre.

L'existence dans un appareil adoral en fonction, ou uniquement dans la stomatogenèse, d'un système composé d'une, ou de plusieurs membranelles ciliaires du type de l'UM et d'un certain nombre (2, 3, 4, etc. ...) de membranelles polycinétiques du type de l'AZM est, à mon avis, très profondément engendrée dans la phylogenèse des différents groupes des Ciliés constituant leur caractère ancestral commun. Le développement commençant à partir d'ancêtres communs divergea ensuite soit dans une direction formant le tetrahymenium actuel des *Hymenostomata-Tetrahymenina*, soit dans une autre, formant le quadrulus et le peniculus des *Peniculina* (*Paramecium* et autres), ou dans la direction menant vers la domination de l'UM chez *Pleuronematina*, ou bien encore dans la direction créant l'état actuel chez *Thigmotricha* et leur passage dans l'ontogenèse par UM + 4 AZM, etc. Ce développement aboutit ultérieurement, d'après Corliss, à la formation d'un fort système de l'AZM chez *Spirotricha* ou même des spirales adorales très modifiées chez *Peritricha*.

Je crois que dans tous ces cas il faut se rendre compte des effets d'une évolution divergeante, qui conserve les éléments ancestraux, plésiomorphiques, ou les développe à un degré différencié, sans les considérer comme des formes appartenant à une ligne d'évolution en échelle ne constituant que des étapes d'un développement à sens unique.

Pour souligner l'importance des structures adorales composées de UM + n AZM, ou passant par ces stades, je trouve juste et utile d'introduire un terme général déterminant ces structures. Je propose le terme ambihymenium, illustrant bien la duplicité du système. Le „tetrahymenium” serait considéré dans ce cas comme une variation particulière de l'ambihymenium. Une autre variation serait représentée par le système apparaissant au cours du développement des *Thigmotricha*; on peut se figurer encore d'autres modifications, menant soit à la domination de l'UM, soit à la polymérisation de l'AZM.

#### R é s u m é

L'auteur décrit le cours de la stomatogenèse chez les Ciliés du genre *Conchophthirus* (*Thigmotricha*, *Conchophthiridae*) en le comparant aux phénomènes étudiés par Chatton et L w o f f 1936 chez *Proboveria* (*Thigmatricha*)

cha, *Hemisperidae*). Dans les deux cas, en dépit des importantes différences morphologiques et topographiques existant entre ces deux genres, chez l'opisthe apparaît passagèrement un système homologue au tetrahymenium, différant, cependant, par le nombre des membranelles obliques (AZM). L'auteur admet qu'un tel système comprenant une pseudomembranelle (UM) et plusieurs membranelles du type de l'AZM, est généralement répandu parmi les Ciliés empruntant des formes diverses, soit au stade trophique, soit seulement pendant la stomatogenèse, et se trouve profondément enraciné dans leur phylogenèse.

L'auteur propose de le dénommer „ambihymenium” comprenant également en ce terme le tetrahymenium en tant que cas spécial.

#### STRESZCZENIE

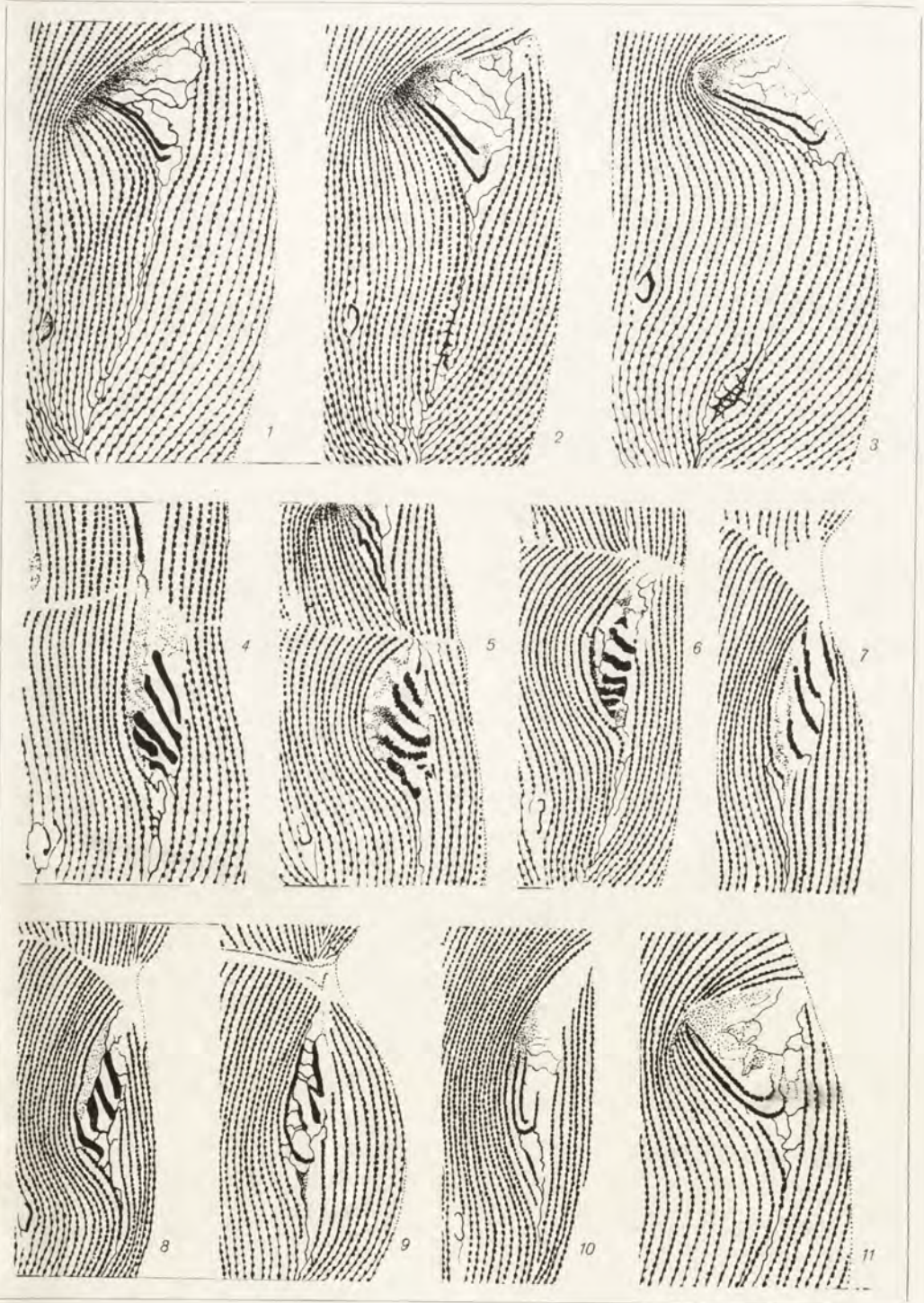
Autor opisuje przebieg stomatogenezy u orzęsków z rodzaju *Conchophthirus* (*Thigmotricha*, *Conchophthiridae*) i zestawia go z procesami badanymi przez Chatton et Lwoff 1936 u *Proboveria* (*Thigmotricha*, *Hemisperidae*). W obu przypadkach, mimo znacznych różnic morfologicznych i topograficznych, u tylnego osobnika potomnego pojawia się czasowo układ homologiczny do tetrahymenium, lecz różniący się od niego liczbą skośnych membraneli (AZM). Autor przyjmuje, że układ składający się z jednej pseudomembraneli (UM) i paru lub wielu membraneli typu AZM, występujący bądź w stanie troficznym, bądź jedynie w rozwoju aparatu gębowego, jest szeroko w różnej postaci rozpowszechniony wśród orzęsków i tkwi głęboko w ich filogenezie. Autor proponuje dla niego nazwę „ambihymenium”, którego szczególnym przypadkiem jest tetrahymenium.

#### BIBLIOGRAPHIE

- Chatton E. et Lwoff A. 1936: Les remaniements et la continuité du cinétome au cours de la scission chez les Thigmotriches ancistrumidés. Arch. zool. exp. gén. 78, 84—91.
- Chatton E. et Lwoff A. 1949: Recherches sur les Ciliés thigmotriches. Arch. zool. exp. gén. 86, 169—253.
- Corliss J. O. 1960: Comments on the systematics and phylogeny of the protozoa. Syst. Zool. 8, 169—190.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Morphologie comparée et systématique des Ciliés. Bull. Soc. Zool. France 75, 109—122.
- Raabe Z. 1933: Untersuchungen an einigen Arten des Genus *Conchophthirus* Stein. Bull. int. Acad. Pol. Sci. Lettr. B, II (1932), 295—310.
- Raabe Z. 1934: Weitere Untersuchungen an einigen Arten des Genus *Conchophthirus* Stein. Mém. Acad. Pol. sci. Lettr. B (1934), 221—235.
- Raabe Z. 1959: Recherches sur les Ciliés Thigmotriches (*Thigmotricha* Ch. Lw.). VI. Sur les genres „*Ancistruma*”, „*Ancistrumina*” et les genres voisins. Acta Parasit. Pol. 7, 215—247.

#### EXPLICATION DES PLANCHES I—II

- 1—11: Stades de la stomatogenèse chez *Conchophthirus unionis* Raabe (1, 2, 4—10) et *C. curtus* Englm. (3, 11). 1: Individu trophique. 2—3: Stade. I. 4—9: Stade III. 10—11: Stade V.
- 12: *Conchophthirus unionis* dans le I stade de la stomatogenèse.
- 13: Le même stade chez *C. curtus*.
- 14—16: Stade III de la stomatogenèse chez l'opisthe de *C. unionis*.
- 17: Stade V chez l'opisthe de *C. curtus*.

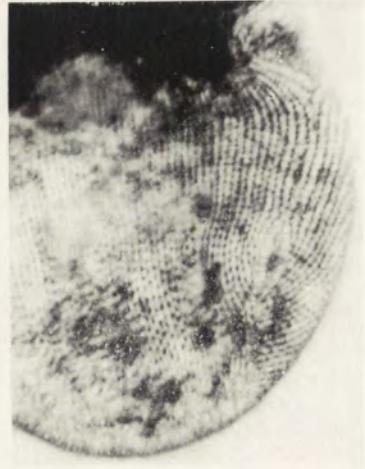


Z. Raabe

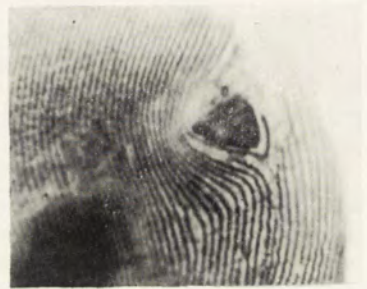
auctor del.



12



13



17



14



15



16

Z. Raabe

auctor phot.

Maria WOLSKA

## Morphology of the buccal apparatus in *Balantidium coli* (Malmsten, 1857)

Budowa aparatu gębowego *Balantidium coli* (Malmsten, 1857)

Although numerous papers concerning the genus *Balantidium* Clap. have been published, the morphology of its representatives is not sufficiently investigated and their taxonomic position is not precisely determined. The opinions of authors concerning the structure of the buccal organ in *Balantidium* are controversial: some authors indicate the affinity to *Heterotricha* (presence of membranellae), others support the opinion of Fauré-Fremiet 1955 including this genus to *Holotricha* and even to the primitive group of *Trichostomata*. The differences of opinion are accompanied by not uniform terminology. In the present paper the terminology of Corliss will be followed.

Fauré-Fremiet 1955 proved that *Balantidium* should be included into the *Holotricha*, basing this view on his study of *B. elongatum* and *B. entozoon*. He also indicated that in the publications of the earlier authors no reasons were found for placing *Balantidium* among *Heterotricha* because none of those authors (Stein 1867, McDonald 1922, Nagahana 1932, Watson 1945 and others) found the transverse or the oblique membranellae (AZM) in *Balantidium*. Only some longer or more densely situated cilia were found on the left margin of the peristome. The problem of including *Balantidium* to a definite order seems to be unsettled.

Ten Kate 1927 gave the following description of the ciliature of the oral region in *Balantidium*: „Wir sehen ventral an der rechten Seite die Membranellen mit ihren dreieckigen Basallamellen durch welche Fibrillen von Basalsaume nach der Spitze zu laufen. An dieser Spitze ist eine Fibrille befestigt, welche schief nach der Pellikula zu verläuft. An der linken Seite finden wir keine Membranellen, sondern einige grössere und stärkere Cilien”.

Ray 1932 in *B. sushili* from *Rana tigrina* described big, strong cilia on the left margin of the peristome and below them „...undulating membrane hangs into the mouth cavity”.

Nie 1950 gave an extensive description of the oral region structures in *Balantidium caviae*. According to his description and his illustrations there is „a collar-like peristomal lip” around the peristome. This collar is „...derived from the thickened pellicle” and has a high refraction coefficient in the living ciliate. The collar is protruding mostly on the dorsal side and is sinking inside the cytoplasm on the ventral side. On the surface, the collar meets the superficial cilia, which converge to its margin. There is neither a ring of special adoral cilia nor a membranella in *B. caviae*. Longitudinal ranges of somatic cilia initiate in the furrow

surrounding the collar. Since the collar begins to sink into cytoplasm on the left side — the furrow deepens also, together with the cilia of this region, which produces a deceptive impression as if they were placed in the cytopharynx. The author concludes that *B. caviae* ought to be placed rather among *Holotricha* than included to *Heterotricha*, but „...until a detailed comparison with the type species of the genus has been made, it seems better to make no change”.

Auerbach 1955 distinguished in *B. coli* the adoral cilia which are longer and stronger than others. They begin on the ventral side of the peristome and run along its left margin, pass over to the anterior margin, continue their course on the ventral side and return to the cytostome.” The adoral cilia appear as separate structures except in the cytostome and cytopharynx where they are seen as fused cilia — the adoral membranellae. Each of latter consists of a densely staining basal plate in which are embedded the basal granules of its component cilia”. Auerbach's description is similar to that given by Mc Donald 1922.

Fernandez-Galiano 1952 in his study on neuromotor apparatus in *Balantidium elongatum*, *B. entozoon* and *B. galianoi* described the membranellae on the left margin of the peristome in *B. elongatum* and *B. entozoon*.

Krascheninnikow and Wenrich 1958 called attention to the fact that membranellae reported by Fernandez-Galiano are not the actual membranellae because each of them is composed of a single row of cilia and they lie on the left margin of the peristome. It seems essential that those structures are originating from the somatic cilia and are their continuation, so the term „membranella” is used in an arbitrary sense and is not equivalent in meaning with AZM. Krascheninnikow and Wenrich failed to state the presence of membranellae in *B. coli* and in *B. caviae*. They only found rows of kinetosomes spreading from the oral opening towards the margin of the peristomal field where they seem to pass into the kineties of the anterior part of the body.

This short review of literature plainly shows that the further study of the oral ciliature in *Balantidium* is necessary. The present study on *B. coli* Malmsten is an attempt to extend our knowledge of this — according to Mackinnon and Hawes 1961 — „misunderstood genus”.

\*

Material from the coecum of pig was obtained from the Municipal Abattoir of Łódź. In few cases the culture of *B. coli* from the Biology Department of the Military Academy of Medicine of Łódź was used as well as the own culture of the Department of Systematic Zoology of the University of Łódź. For most preparations the Chatton's method, for a part of them that of Rio Hortega's after Fernandez-Galiano 1959, slightly modified was applied, some of them were treated by the Bielszowski procedure. Rio Hortega's method was modified as follows. After fixation in 10% formalin and rinsing in distilled water, the ciliates were transferred upon a warmed slide into a warm drop of gelatine (after Chatton); after being stirred, the gelatine drop was spread over the slide so as to form a possibly thin layer which became solid in refrigerator. Then the method of Fernandez-Galiano was followed. Zeiss' phase contrasting was used for observation of the living material.

\*

*B. coli* is coated with a dense ciliature. Kineties (60—80 in number) are running somewhat obliquely along the body, they are confluent on its anterior end of the ventral side surrounding here a triangle-shaped depression



(Pl. I 1, 2). Not all the kineties on the dorsal side may reach the anterior pole. Then the suture arises. However, it is not certain whether the suture is always present. Not in all the individuals examined by Krascheninnikow 1961 the suture was found but in general its occurrence was not excluded. In the present study the suture was not stated in most individuals but this might be the result of an irregular position of the ciliates in the preparations. In one individual, a suture of another type was observed: some kineties failed to reach the posterior pole (Fig. 1 and Pl. I 3). The anterior sectors of the kineties on



Fig. 1. Suture at the posterior pole of the body



Fig. 2. Kineties in the buccal cavity

the ventral and lateral surfaces bend down towards the depression; in this way the vestibulum is formed. Vestibulum is the deepest on the ventral side where it forms a narrow funnel oriented to the inside of cytoplasm, somewhat to the left and to the dorsal side. On the ventral side the bent sectors of kineties are the longest. On the left margin of vestibulum the kineties bend gradually beginning from a point near the dorsal edge. On the right margin, the bending begins rather abruptly near the ventral edge. It looks as if the edge was cut and turned up. (Pl. I 4). At the vestibulum edge, kinetosomes are situated more densely (Pl. I 5). The terminal kinetosomes are larger than others and distinctly visible throughout the cytoplasm layer (Pl. I 6). When observing the living material, only the cilia described in vestibulum were seen because the rapid movement of the long cilia in the anterior part of the body was screening the observation area. The silver impregnation method of Chilton failed to give fully positive results. Only fragments of kineties were seen running deeper than the vestibulum area. Yet those fragments occur in numerous preparations in a similar pattern, so that their juxtaposition may give the approximate picture of the whole.

In the space lying deeper than the vestibulum — which should be called the buccal cavity — sectors of kineties independent from the somatic kineties appear with unequal intensity in different individuals. Photographs (Pl. I 7 — III 22) and Figs. 2 and 3 illustrate those structures. In diagrams the external margin of vestibulum is marked by a full line and by a dotted one — the final kinetosomes of the bent kineties i.e. the limit of the vestibulum area. The photographs show the silver impregnated row of kinetosomes and, in some of them — two rows on the left side. Those kineties enter always the deep part of the buccal cavity (infundibulum), leading to the cytostome. This system of kineties on the left side appears invariably in strongly silver-impregnated

specimen. A similar system of one or two rows was noticed in other preparations on the right side. In some instances, the row of kinetosomes of the left side seems to be continuous inside the funnel with the analogous row of kinetosomes of the right side. In other cases this continuity was not observed. When the position of the ciliate allows the observation of the whole dorsal

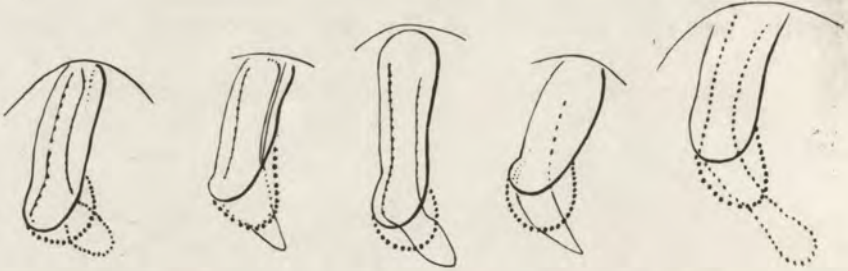


Fig. 3. Diagrams showing the kineties in the buccal cavity

margin, the continuity of kineties of the left and right side is visible. This arc on the dorsal margin is well seen in Pl. III 23 and III 24.

The above pictures may be interpreted as follows: below the vestibulum (deeper) two rows of densely situated kinetosomes, i.e. presumably two undulating membranes (UM) surrounding the buccal cavity exist. Usually single kinetosomes are seen distinctly, but sometimes they adhere closely one to another or fuse into one entity, which probably depends on the state of contraction of the ciliate in the moment of fixation. The whole anterior body end of *B. coli* is very contractile; the volume of the buccal cavity may, in consequence, vary considerably. This fact involves also the variation in the length of the distance between the kinetosomes. Variation may also concern the distance between the kineties in different sectors even in the same specimen which is involved by the unequal contraction or extension of some parts of the buccal cavity. The undulating membranes form a sort of collar which may be sometimes seen in the dorsal side. Membranes seem to originate on the right ventral side of the buccal cavity. In this region the position of kineties is not distinct; in most cases no continuity was observed. The best picture of the described elements in the buccal cavity is presented in the Pl. III 25 where two rows of kineties on the left and right are seen simultaneously.

Probably each of the kinetosome rows is actually composed of two rows closely adhering one to another, as it may be seen in the preparation represented in Pl. III 26 and 27 where in some sectors a split in the row is seen. On the left side — as it seems — four rows are fused together producing a single element, on the right — among four rows, two joined by transverse desms can be distinguished.

It seems impossible to decide whether those diplokineties remain double along the course of the membranes, as only the segments of the kineties are found to be split: the kinty might be in one part a diplokinety and in another a haplokinety. Perhaps those kineties approach and depart one from another for the same reason as it has been described for kinetosomes.

After the modified Rio Hortega method, which is not always effective, the above described elements failed to impregnate, but another structures, abundant in the oral region and very scarce in other places of the body were revealed. These are fairly thick rods, strongly impregnated, regularly disposed on the right dorsal margin of the buccal cavity and of vestibulum (Pl. III 28,

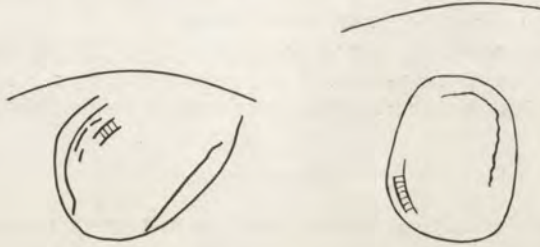


Fig. 4. Diagrams showing the double character of the kineties in the buccal cavity

III 32). A regular row of about 20 rods is forming an arc on the right dorsal margin. Besides, deeper on the right margin and over the whole area of the buccal cavity, a great number of those rods scattered irregularly was often seen. The regularity of rods on one side suggests their role as a supporting element. They may support the right thin, bent up, margin of vestibulum. On the other hand, their occurrence in other places and their protruding into the cytoplasm on the dorsal side — indicate that they are rather trichits, able to a defensive activity. Possibly they may perform both functions.

There may arise a supposition that the Chatton's impregnation method and the modified Rio Hortega's procedure reveal the same structures. It should be stressed that the characteristic pattern of the system of rods, their size and dispersion over the whole body exclude the above possibility.

The observations presented in this paper allow to conclude that in *Balantidium coli* the oral apparatus is constructed in a more complicated manner than it was found by Fauré-Fremiet. Except the vestibulum which shows a simple construction and is typical for *Holotricha-Trichostomata*, (i.e. with the ends of kineties of the general ciliature entering it) there exist the buccal cavity with its own ciliature. The oral ciliature seems to be composed of two double kineties running in loop-like lines and showing the resemblance to an undulating membrane. For that reason *Balantidium coli* (and probably all the genus *Balantidium*) being placed among *Holotricha* cannot be considered as a representative of *Trichostomata*. Its position among *Hymenostomata* could be precised in the course of further research.

### Summary

In *Balantidium coli* (Malmsten), besides the vestibulum into which the ends of kineties of the general ciliature enter and terminate, the buccal cavity is present with two (perhaps double) kineties with a loop-like bending. These kineties are of an undulating membrane (UM) type. For that reason the position of *Balantidium coli* among *Holotricha* is grounded, but the including of this genus into the order *Trichostomata* evokes objections.

## STRESZCZENIE

Badano aparat gębowy *Balantidium coli* (Malmsten) na materiale pochodzącym z jelita świni, świeżo pobranym albo hodowanym. W preparatach srebrzonych metodą Chatton'a stwierdzono obecność dwóch błonek falujących (UM), które przebiegają pętlowato w głębi peristomu. W preparatach srebrzonych zmodyfikowaną metodą Rio Hortega wykryto trichity, bardzo liczne w peristomie, a rzadko rozsiane na pozostałej powierzchni ciała.

Zdaniem autorki, obecność błonek falujących typu UM w aparacie gębowym *B. coli* potwierdza słuszność zaliczenia tego gatunku przez Fauré-Fremiet 1955 do *Holotricha*, lecz wątpliwe staje się włączanie go to *Trichostomata*.

## REFERENCES

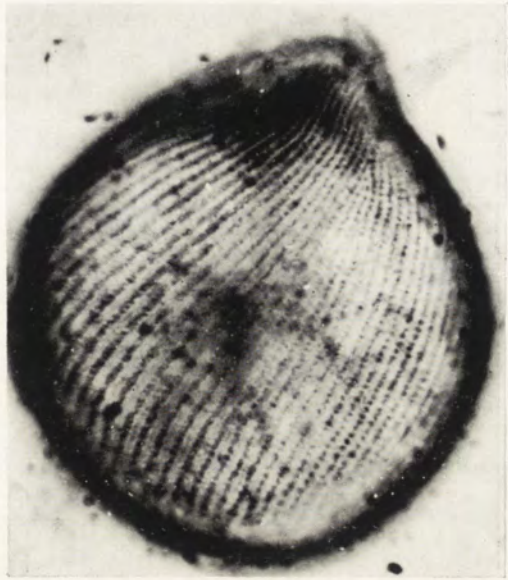
- Auerbach E. 1955: A study of *Balantidium coli* Stein 1863, in relation to cytology and behavior in culture. *J. Morphol.* 93, 405—445.
- Fauré-Fremiet E. 1955: La position systematique du genre *Balantidium*. *J. Protozool.* 2, 54—58.
- Fernandez-Galiano D. 1952: Los sistemas fibrilares de las especies del genere *Balantidium*. I. *Balantidium elongatum*. *Trab. Inst. Cienc. Nat. Jose de Acosta. S. Biologica.* 4, 5—36.
- Fernandez-Galiano D. 1952: Los sistemas fibrilares de las especies del genere *Balantidium*. II. *Balantidium entozoon* y *Balantidium galianoi*. *Trab. Inst. Cienc. Nat. Jose de Acosta. S. Biologica.* 4, 69—80.
- Fernandez-Galiano D. 1959: La infraciliacion en *Cycloposthium edentatum* Strelkow. *Bolet. de la Real Sociedad Espanola de Hist. Natural.* 57, 139—151.
- Krascheninnikow S. 1961: Ciliary patterns in *Balantidium simile* (?) and *B. wenrichi*. *Arch. Protistenk.* 105, 285—302.
- Krascheninnikow S. and Wenrich D. H. 1958: Some observations on the morphology and division of *Balantidium coli* and *Balantidium caviae*. *J. Protozool.* 5, 196—202.
- Mackinnon D. and Hawes R. S. 1961: An introduction to the study of Protozoa. Oxford. Clarendon Press.
- McDonald J. D. 1922: On *Balantidium coli* Malmsten and *Balantidium suis* (sp. nov.). *Univ. Calif. Publ. Zool.* 20, 243—300.
- Nagahana M. 1932: Morphology and culture of a *Balantidium* found in the Wild-Rat (*Mus norvegicus*). *Keije J. Med.* 3, 492—500.
- Nie D. 1950: Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the guinea-pig, *Cavia porcella*. *J. Morphol.* 86, 384—493.
- Ray H. 1932: On the morphology of *Balantidium sushilii* n.sp. from *Rana tigrina* Daud. *J. Roy. Microsc. Soc.* 52, 374—384.
- Stein F. 1867: *Der Organismus der Infusionsthier.* Leipzig.
- Ten Kate C. G. B. 1927: Über das Fibrillensystem der Ciliaten. *Arch. Protistenk.* 57, 362—426.
- Watson J. M. 1945: The identity of the ciliate *Balantidium minutum* an alleged parasite of man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 39, 151—160.

## EXPLANATION OF PLATES I—III

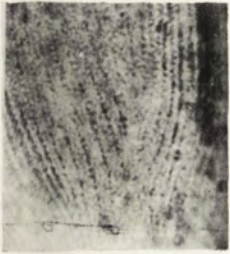
- 1—2: General view of body kineties.  
 3: Suture at the posterior pole of the body.  
 4—6: Kinetosomes in the vestibulum.  
 7—22: Kineties in the buccal cavity.  
 23—24: Continuity of kineties of the left and of the right side of the buccal cavity.  
 25: Two rows of kineties in the buccal cavity.  
 26—27: Double aspect of kineties in the buccal cavity.  
 28—32: Trichits impregnated after Rio Hortega technique.



1



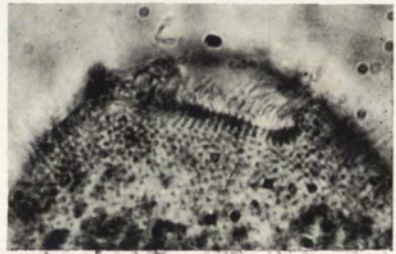
2



3



4



5



6



7



8



9



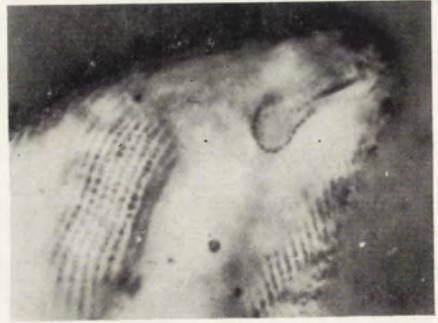
10



11



12



13



14



15



18



19



16



20



21



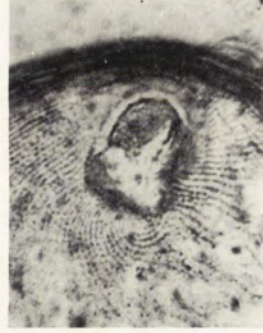
17



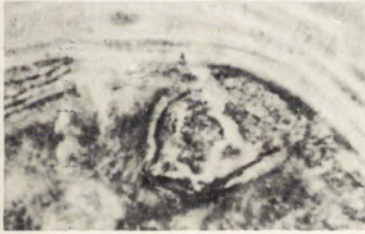
22



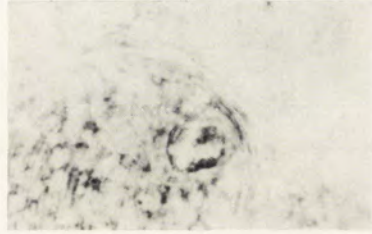
23



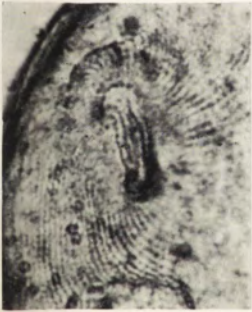
24



26



27



25



28



29



30



31



32

M. Wolska

auctor phot.





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

Jiří VÁVRA

## Spore projections in *Microsporidia*

### Vyběžky spor u mikrosporidií

Even in the modern taxonomy of *Cnidosporidia*, the spores are still very important for the determination of species. Since the spores of *Microsporidia* are very uniform both in shape and size, any new morphological details found in the spores are of special importance for the taxonomists. E.g., mucous envelopes as a taxonomic character of microsporidian spores have recently been described by Lom and Vávra 1961, 1962. The aim of this paper is to show that the use of simple techniques which are not common in studies of *Microsporidia* may reveal interesting spore projections in some species.

### Material and methods

The following species of *Microsporidia* from freshwater animals have been examined: *Gurleya* sp. from *Cyclops strenuus*, *Pyroteca* (*Glugea*) sp. from *Eucyclops serrulatus*, *Thelohania cladocera*, *Plistophora schäfernai*, *Nosema elongatum*, *Bacillidium cyclopis*, *Nosema cyclopis*, *Nosema parva*, *Dubosquia* sp. from *Macrocyclus albiduus*, *Cougourdella magna*, *Gurleya* sp. from *Daphnia pulicaria*, *Plistophora multisporea*, *Plistophora debaisieuxi*, *Thelohania bracteata*, *Nosema stricklandi*, *Thelohania varians*, *Thelohania fibrata*.

Three techniques have been used: 1. dry smear preparations of water suspension of spores mixed with an equal quantity of Burri ink for bacteriological purpose, 2. the same as in 1, only with ordinary drawing Indian ink, 3. observations of spores lying in a very thin layer of water under the cover slip, by means of phase contrast microscope.

### Observations

Spore projections have been found in two species, listed here as „sp.”, detailed description of which is being prepared.

In *Gurleya* sp., commonly parasitising in the fat body of *Cyclops strenuus*, two thin bounds of filaments, 10  $\mu$  in length, proceed from the anterior end of the spore. The filaments are apparently of some rigidity, because they regularly lie on the smear preparations in the prolongation of the longitudinal axis of the spore (Pl. I 2). This position may recall the extruded polar

filament but no relation exists between these two structures. In younger spores the filaments are less distinct and evidently soft (Pl. I 1). Similar filaments proceed from posterior poles of the spores connecting a group of spores originating from the same pansporoblast (Pl. I 2). In this species a powerful mucous envelope can be seen in spores spread in water. When swelling the mucus stretches the originally closely packed group of spores into a characteristic cross formation. The spores are mutually connected and the filaments connecting the bases of spores evidently prevent the separation of individual spores. It is interesting to know that both the anterior and posterior filaments are visible only on smears imbued with Burri ink. Because of their rigidity, the filaments stretching out from the anterior pole of the spore of *Gurleya* sp. may be considered as a supporting structure for the extrasporal mucus.

Long, very thin and pliable filaments have been found on spores of *Pyroteca* (*Glugea*) sp., parasite of the fat body of *Eucyclops serrulatus*. The filaments are protruding from the space between two spores originating within the same pansporoblast. In dry smear preparation with normal Indian ink the filaments may be seen in various position to the spore (Pl. I 5) but the observation of spores in a thin water layer confirms that the filaments stretch backwards from the posterior end of the group of spores (Pl. I 4). There is no relation between the filaments described and the polar filament itself as shown in Pl. I 6, where both the extruded polar filament and filamentous spore projections exist. The filaments in *Pyroteca* (*Glugea*) sp., seem to be very fine, for all attempts have failed to reveal them with Burri ink.

### Discussion

The spore projections described in the literature up to this time are far more conspicuous than the filaments mentioned above. Goodrich 1920 found three 20  $\mu$  long projections coming out from the wider end of the spore of *Thelohania octospora*. Sabre- or rod-like projections are even characteristic for the genus *Mrazekia*, with the length varying from 2.5  $\mu$  in *M. brevicauda* up to 18  $\mu$  in *M. caudata*. The genus *Caudospora* with single species *Caudospora simulii* described by Weiser 1946 seems to have received its name from a conspicuous caudal projection up to 24  $\mu$  long.

Rib-like thickenings of the outer sheath of microsporidian spores found in many species (see Weiser 1959, Krieg 1955, West 1960) are most probably predecessors of spore projections. E. g. in *Nosema stricklandi* the thickenings of the spore surface are extended into small thorns (Pl. I 3). It is supposed that also in many other members of the genus *Gurleya* exist the spore projections similar to projections described above, because, e.g. the spores of *Gurleya francoetti* could be found in the same characteristic formations. Careful observations using unconditionally all techniques described above must accompany a searching for spore projections in species. It must be pointed here once again that some types of filaments can be observed only in Burri ink, some others only in Indian ink.

As for the function of spore projections, it may be assumed that they may play an important role by connecting the spores in the pansporoblast

or by supporting the mucous envelope (e.g. in *Gurleya* sp.) or by enabling the spores to float easier in water. The latter appears to be the function of the pansporoblast membrane projections in *Trichodubosquia epeori*.

### Summary

Thin, filamentous spore projections, a new taxonomic feature of *Microsporidia* may be found in some species on smears with Burri or Indian ink, or by observation of spores lying in thin layer of water using phase contrast microscopy. The occurrence of spore projections in *Microsporidia*, their morphology and probable function has been discussed.

### SHRnutí

Pozorováním spor mikrosporidií na roztěrech s Burriho tuší, kreslící tuší nebo v tenké vrstvičce vlhkosti ve fázově kontrastním mikroskopu, byly nalezeny tenké, vláknité výběžky charakterisující spory některých druhů.

Je diskutován výskyt sporových výběžků u mikrosporidií, jejich morfologie a pravděpodobná funkce.

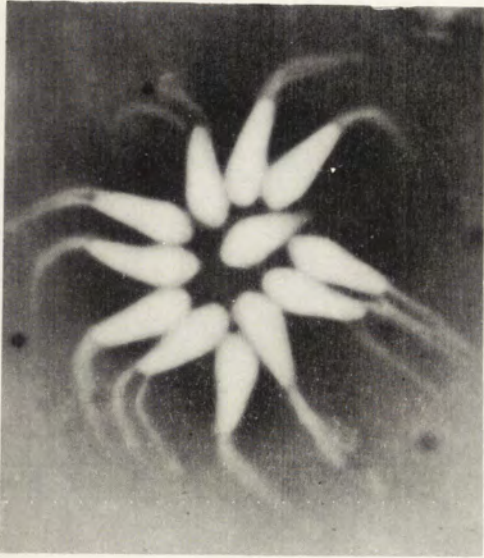
### REFERENCES

- Goodrich H. 1920: The spore of *Thelohania*. Arch. Zool. Exp. 59, 17—19.
- Krieg A. 1955: Ueber Infektionskrankheiten bei Engerlingen von *Melolontha* spec. unter besonderer Berücksichtigung einer Mikrosporidien-Erkrankung. Zentr. Bakt. II 108, 535—538.
- Lom J. and Vávra J. 1961: Mucous envelope as a taxonomic character in Cnidosporidian spores. J. Protozool. 8 (Suppl.).
- Lom J. and Vávra J. 1962: Mucous envelopes of the spores of the Subphyllum *Cnidospora*. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. (in press).
- Weiser J. 1946: Studie o mikrosporidiích z larev hmyzu našich vod. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 10, 245—272.
- Weiser J. 1959: *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the Microsporidian spore. J. Insect. Pathol. 1, 52—59.
- 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.

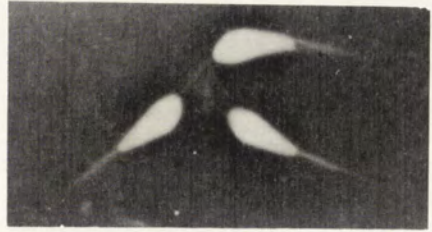
### EXPLANATION OF THE PLATE I

- 1: Abnormal, twelve member asterisk formation of spores of *Gurleya* sp. showing clearly thin bounds of filaments stretching from anterior ends of the spores.
- 2: Spores of *Gurleya* sp. with anterior and connective spore projections.
- 3: The spore of *Nosema stricklandi* with small thorns on its surface. Phase contrast.
- 4: Long filamentous spore projections of *Pyrotheca* (*Glugea*) sp. observed in a thin water layer.
- 5: Spore projections of the same species as on 4, but revealed by use of Indian ink.
- 6: Like 4, showing extruded polar filament (a) and the spore projections (b),





1



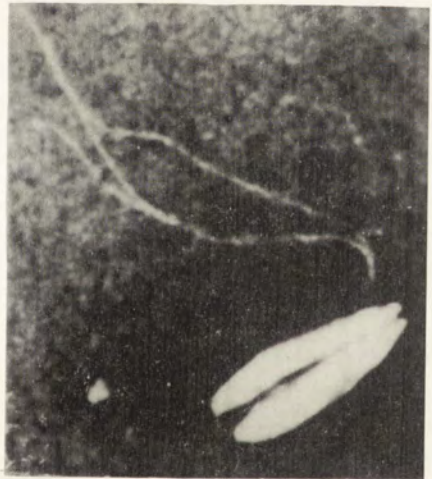
2



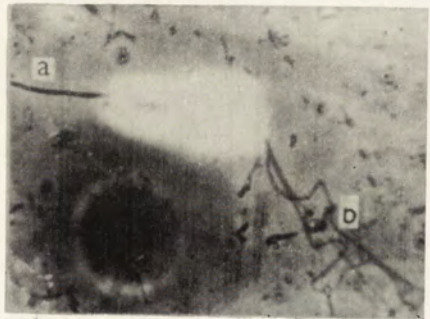
3



4



5



6

J. Vávra

auctor phot.



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

A. GRĘBECKI and L. KUŻNICKI

## The influence of external pH on the toxicity of inorganic ions for *Paramecium caudatum*

Wpływ pH środowiska na toksyczność jonów nieorganicznych  
dla *Paramecium caudatum*

In the previous studies on toxicity of salts toward the protozoa cell some regularities were found which prove an essential relation of the resistibility to the electrophysiological properties of protozoa and to the electrochemical character of the acting ion. Grębecki and Kuźnicki 1955a, 1955b and 1956b stated that toxicity of the salt compound depends before all on the action of cation, anion performing only a slightly modifying role. This regularity has been studied in the case of inorganic salts, organic acids salts, cation and anion stains, alkaloids. The observation of Woodruff and Bunzel 1909 concerning the relation between toxicity of the metallic cation and its ionic potential was also confirmed by those investigations on a more extensive material.

The above results indicate that the toxic action of the ion is the more powerful the stronger it is adsorbed by the surface of *Paramecium* which possesses a considerable negative electrokinetic potential (Grębecki 1962a, 1962b). As it is known, the potential grows with the increasing alkalization of medium, and falls with its acidification, reaching the isoelectric point at  $\text{pH}=5.25$  (Grębecki 1962c). As a consequence, the changes of ion toxicity bound to the pH of medium might be expected. This theory seems to be supported also by following results of earlier research.

1. The intensity of uptake of stain by *P. caudatum* rises with alkalization and rapidly falls in the zone of isoelectric point (Grębecki 1962d). 2. In pinocytosis, the adsorption of fluoroscein by the superficial structures of the protozoa cell is inhibited by a high, and stimulated by a low pH (Chapman-Andresen and Holtzer 1960, Grębecki 1962e). 3. In *P. caudatum*, toxicity and photo-sensibilizing effect of cation fluorochroms rises with the increase of pH; the action of anion fluorochroms is weaker under those conditions (Beck and Nichols 1937); similarly the toxicity of alkaloids toward various protozoa increases with the alkalization of medium (Loeb 1898, Prowazek 1910, Crane 1921, Henry and Brown 1923).

Considering all the above statements, experiments were undertaken to

prove the supposition that the influence of pH upon the ion toxicity in *P. caudatum* should be correlated with the influence of pH upon the electrokinetic potential of this ciliate.

### Methods

Experiments were carried out on *P. caudatum* clone cultivated in our laboratory for 10 years on powdered milk nutrient. PH was adjusted by a series of buffers applied to protozoa by Dryl 1959, 1961, modified so that all the solutions had equal ionic strength in all the experiments. Composition of buffer series after the above correction is shown in Table 1. When compared with Dryl's buffer, the composition of the neutral buffer is not changed. The series is composed so that the neutral pH, the pH of the isoelectric point of the paramecium surface, pH below and above these values and the intermediate are taken into consideration. All the substances applied in the experiments were diluted in the corresponding buffer solutions. Paramecia taken from the culture 24 hours prior to experiment were rinsed several times with the corresponding buffer until the initial medium became diluted 1000 times.

Table 1

Composition of buffer solutions with the constant ionic strength  
(the concentrations in mM)

Substance	I	II	III	IV	V	VI
CaCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1
Sodium citrate	2	2	2	2	2	2
Citric acid	1	0.6	—	—	—	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	4.4	4.5	2.5	—	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—	0.5	2.5	5	2.35
NaOH	—	—	—	—	—	0.9
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	2.5
pH	4.90	5.28	6.27	7.06	8.11	8.75
Ionic strength I = 0.090						

For determination of toxicity of the given substance in a determined pH, the methods used previously (Grębecki and Kuźnicki 1955a) were applied. One ml of buffer containing about 200 individuals was mixed with 1 ml of a defined solution of the studied substance prepared in the same buffer. LD<sub>50</sub> for each substance was determined after 24 hrs exposure to different concentrations.

All the experiments were executed in the temperature 22°—24°C. The stability of the experimental medium was proved many times by controlling pH value with potentiometer at the beginning of experiment and 24 hrs later.

Three separate control experiments were carried out.



1. Pure buffer test: ciliates left in the pure buffered medium survived and behaved normally in all experimented pH.

2. The glucose toxicity test: LD<sub>50</sub> for glucose was the same in all buffers, which indicates that the differences in the chemical composition of different buffers applied cannot affect directly resistibility of the cell under study.

3. The NaCl toxicity test: after a detailed study of NaCl toxicity in all the buffers the test with NaCl was repeated as a control parallelly to tests performed with all other salts; when the NaCl test differed from the primary result — the experiment was repeated.

In conclusion, the first type of control showed the general viability of the ciliates, the second made the results at different pH comparable, and the third — made comparable the results for different salts.

### Results

For the study of the influence of pH upon the toxic action of cation, LD<sub>50</sub> of four metal chlorides was determined in 6 buffer solutions. The toxicity of those salts has been previously investigated (Grębecki and Kuźnicki 1955a, 1956b). In the present study one cation of a low toxicity (Na<sup>+</sup>), two moderately toxic ions (Ba<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>), and one ion of a high toxicity (Ni<sup>2+</sup>) were experimented. The low solubility of most phosphate salts made the study of more extensive series of cations impossible. For the same reason the range of investigated pH had to be restricted in the case of Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>. The dependence of LD<sub>50</sub> for the cation studied on the pH of medium is visualized in the diagram (Fig. 1). It is evident that the resistibility of *Paramecium* against the toxic action of cations falls with the alkalization of medium and rises with its acidification. The increase of resistibility of *Paramecium* (i.e. the fall of the ion toxicity) occurs at the pH values corresponding to the isoelectric point zone of the ciliate surface.

The differences of the value of toxicity at various pH are distinct. E.g. in the case of Na<sup>+</sup> the increase of LD<sub>50</sub> at pH=4.90 amounts 24% and at pH=8.75 the fall is 17% of its value in the neutral medium. For Ni<sup>2+</sup> the increase of LD<sub>50</sub> in acid medium ranges up to 85%. In general, the higher the toxicity of the cation the more depending on the pH it is.

The influence of pH upon the toxic action of anions was also proved in a similar way. LD<sub>50</sub> of four solutions of sodium salts studied previously (Grębecki and Kuźnicki 1955a, 1956b) was determined. Two anions of a low toxicity (Cl<sup>-</sup> and Br<sup>-</sup>), one of a medium (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) and one of a fairly high toxicity (CN<sup>-</sup>) were chosen. The low solubility of the majority of Ca salts compelled to reduce the series of anions and the range of experimented pH in the case of CN<sup>-</sup>.

The results of this experiment are shown in the diagram (Fig. 2). The curves for Cl and Br salts proved to be almost the same and — as it should be expected — the toxic action of those salts increased with the alkalization of medium and fell with its acidification. This result proves that the curve of toxicity is in fact the curve of toxicity of the sodium ion, which may be just slightly modified by the action of anion of a low toxicity. In the cases when the anion is more toxic and probably exerts an essential influence upon

the toxicity of the experimented salt ( $\text{WO}_4^{2-}$  and  $\text{CN}^-$ ),  $\text{LD}_{50}$  is independent from the pH of medium.

The above results are also consistent with the theoretical anticipations. Even the rise of toxicity of anion in low pH and its fall in the high one (i.e. the reverse regularity to that found for cations) could be expected, but pro-

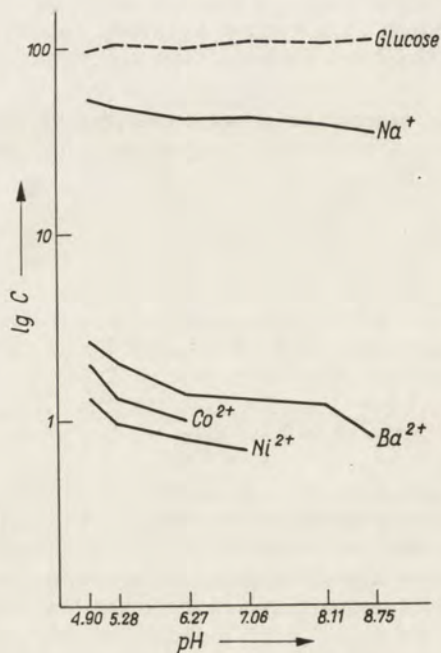


Fig. 1. Relation between the external pH and the concentration of metallic chlorides need for killing 50% individuals in 24 hrs.

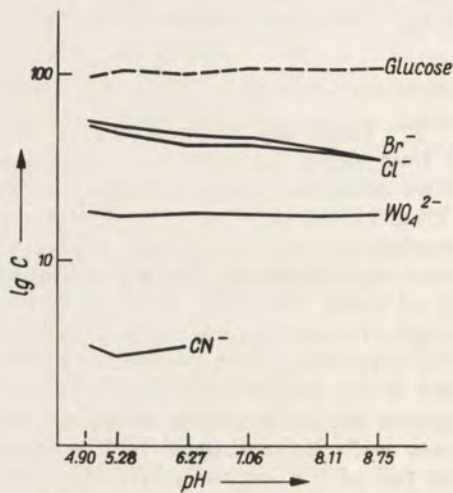


Fig. 2. Relation between the external pH and the concentration of sodium salts need for killing 50% individuals in 24 hrs.

bably this regularity cannot manifest because the range of pH experimented almost entirely lies above the isoelectric point. It results of this fact that the isoelectric point ( $\text{pH}=5.25$ ) of the surface of *Paramecium caudatum* (Grębecki 1962c) lies near the acid limit of survival which was determined in the previous studies (Grębecki and Kuźnicki 1956b, Dryl 1961) at  $\text{pH}$  4.63 — 4.68.

It may be observed in all cases that the changes of pH act not only on the ion average toxicity expressed by  $\text{LD}_{50}$  but also on the individual variation of the resistibility of *Paramecium* in the experimental sample. This may be proved when not only  $\text{LD}_{50}$  is compared but also those concentrations of the experimented substance in which the first dead individuals appear and those in which the last living paramecia may still be observed. Results of this kind of comparison executed with barium ions are indicated in the diagram (Fig. 3). The observed range of concentration is plainly being reduced as the alkalization of medium is rising which indicates that the rise of pH va-

lue of medium is diminishing the individual differences in resistibility of *Paramecium*.

In general, the toxicity of ions revealed in this study is fairly consistent with the data obtained previously (Grębecki and Kuźnicki 1955a, 1956b). A slight rise of toxicity of ions acting on the osmotic way (of

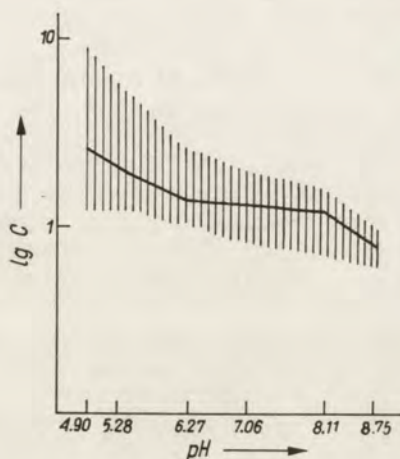


Fig. 3. Relation between the external pH and the concentration of barium chloride corresponding to LD<sub>50</sub> and to the range LD<sub>0</sub>-LD<sub>100</sub> (for 24 hrs exposures)

a low toxic power), may be accounted for by the fact that osmotic pressure of buffers applied in this study was higher than it was in the medium used previously. Then, the slight fall of toxicity of the strong toxic ions is involved by the protective action of Ca ions (Kuźnicki 1963) as their content in the buffers was much higher than in the media applied previously.

### Discussion

The influence of pH upon toxicity of inorganic ions for *P. caudatum* stated in the present paper may be explained in different ways:

1. It could be assumed that pH acts directly upon the substance introduced into the medium (e.g. upon the degree of dissociation). In this sense the changes in toxicity of alkaloids (Crane 1921, Henry and Brown 1923), and of amines (Howland and Bernstein 1934) evoked by pH were explained by the earlier authors. This conclusion may be correct when substances of a low dissociation coefficient are concerned but seems little probable in the case of strong electrolytes.

2. pH may be supposed to change the susceptibility of the internal structures of the cell to the toxic action of ions. This conclusion seems also little probable because pH of medium may change the internal pH of the cell only in a slight degree. This fact has been recently stated for many kind of cells by the use of the microelectrodes technique (Arvanitaki et Chalazonitis 1951, Caldwell 1954 and 1958, Hill 1955, Sorokina 1961). Evidently this fact is involved by the considerable buffer capacity of cytoplasm which was stated in *Protozoa* long ago by Pollack 1928.

As a result of that what has been discussed above, it may be concluded that the role of pH in the phenomena of toxicity is connected not with properties of intracellular structures of *Protozoa* but with the properties of its superficial structures. This view seems to be more correct since the acid range of pH in which *Paramecium* shows the highest resistibility against the toxic action of ions, is not consistent with the range of optimal pH for such functions of the ciliate as digestion of food, action of contractile vacuoles, rate of division (Wichterman 1953). On the other side, the range of pH in which the toxicity of ions rapidly falls, is essential for the surface phenomena as e.g. adsorption of stains (Grębecki 1962d) and action of cilia (Dryl 1961).

Nevertheless even considering only the influence of pH upon the surface structures of *P. caudatum*, the parallel changes of toxicity of cations and of the electrokinetic potential suggest two possibilities. It might be concluded that with the alkalization of medium and with the rise of charge of the surface colloids the increase of their hydration occurs i.e. the increase of toxicity would be the result of the rise of the pellicle permeability. The last theory can hardly be accepted since: 1. in this case pH should exert also the influence upon toxicity of substances acting exclusively on the osmotic way yet — as it was stated above — it fails to alter the toxicity of glucose; 2. changes of pH would be expected to act with the same result upon toxicity of a salt with a toxic cation as of one with a toxic anion, which is not consistent with the above results; 3. pH acting essentially upon the permeability of the pellicle should change considerably the intracellular potential; nevertheless it is known that the influence of external pH upon the intracellular potential is scarcely perceptible (Ling and Gerard 1949, Sorokina 1961).

The most probable interpretation of the regularities stated in this research seems to be this one which is based on the supposition that the toxic action of ion depends before all on the degree of its adsorption by the surface structures of the protozoon cell. Consequently the toxicity of salt is determined before all by the cation because in the whole range of pH tolerated by *Paramecium* the surface potential of this ciliate usually is negative. The rise of this potential with the alkalization of medium intensifies the adsorption of cations increasing their toxic action — whereas the fall of surface potential towards the isoelectric point involves the fall of adsorption and of toxicity. Yet the adsorption mechanism itself cannot entirely determine the toxicity of ion. Therefore the adsorption of ion seems to be the fundamental condition to be fulfilled for the manifestation of its toxic action upon *Paramecium*.

### Summary

Toxicity of inorganic cations in *P. caudatum* rises with the alkalization of medium and falls with its acidification, especially if it is close to the isoelectric point of the cell surface. Toxicity of anions seems to be independent from pH in its range studied. Those facts are interpreted as a manifestation of relation between the toxic action of ion and the value of the electrokinetic surface potential, i.e. as a proof of the role played by an electroadsorption mechanism in the toxicity of agent and in the resistibility of cell.

## STRESZCZENIE

Działanie toksyczne kationów nieorganicznych na *P. caudatum* rośnie wraz z alkalizacją środowiska, a spada przy jego zakwaszaniu, szczególnie w pobliżu punktu izoelektrycznego powierzchni komórkowej. Toksyczność anionów wydaje się niezależna od pH w badanym zakresie. Fakty te są interpretowane jako przejaw związku pomiędzy toksycznym działaniem jonu, a wartością elektrokinetycznego potencjału powierzchniowego, tzn. jako świadectwo roli odgrywanej przez mechanizmy elektroadsorpcyjne w toksycznym działaniu czynnika i w oporności komórki.

## REFERENCES

- Arvanitaki A. et Chalazonitis N. 1951: Recherches sur la repartition de quelques catalyseurs respiratoires dans l'espace cellulaire (axon géant et soma neuronique de *Sepia*). Arch. Sci. Physiol. 5, 207—226.
- Beck L. V. and Nichols A. C. 1937: Action of fluorescent dyes on *Paramecium* as affected by pH. J. Cell. Comp. Physiol. 10, 123—132.
- Caldwell P. C. 1954: An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and micro-tungsten electrodes. J. Physiol. 120, 31.
- Caldwell P. C. 1958: Studies on the internal pH of large muscles and nerve fibres. J. Physiol. 142, 22—62.
- Chapman-Andresen C. and Holtzer H. 1960: The uptake of fluorescent albumin by pinocytosis in *Amoeba proteus*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 288—291.
- Crane M. M. 1921: The effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of alkaloids for *Paramecium*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 18, 319—339.
- Dryl S. 1959: 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 caudatum* in relation to pH of medium. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Grębecki A. 1962a: Electrobiologic concept of galvanotaxis in *Paramecium caudatum*. Proceed. Ist. Internat. Conf. Protozool. Praha 1961 (in press).
- Grębecki A. 1962b: Phénomènes électrocinétiques dans le galvanotropisme de *Paramecium caudatum*. Bull. Biol. Fr. Belg. (in press).
- Grębecki A. 1962c: Point isoélectrique superficiel et quelques réactions locomotrices chez *Paramecium caudatum*. Protoplasma 56, 80—88.
- Grębecki A. 1962d: Electrobiologie de l'ingestion des colorants par *Paramecium caudatum*. Protoplasma 56, 89—98.
- Grębecki A. 1962e: Adsorption des fluorochromes par le cytostome des Ciliés. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 10, 483—485.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1955a: Stosunek *Paramecium caudatum* do chemizmu środowiska i ochronny wpływ skupienia wobec substancji nieorganicznych. Folia Biol. 3, 127—157.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1955b: Badania nad reakcjami obronnymi wy-moczków pojedynczych i skupionych w roztworach niektórych substancji organicznych. Folia Biol. 3, 159—182.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1956a: Studia nad odpornością *Paramecium caudatum* wobec niektórych ekologicznie ważnych zmian chemizmu środowiska. Folia Biol. 4, 93—118.
- Grębecki A. and Kuźnicki L. 1956b: Autoprotection in *Paramecium caudatum* by influencing the chemical properties of its medium. Acta Biol. Exp. 17, 71—107.
- Henry T. A. and Brown H. C. 1923: The influence of the medium on the toxicity of certain alkaloids towards protozoa. Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg. 17, 61—71.

- Hill A. V. 1955: The influence of the external medium on the internal pH of muscle. Proc. Roy. Soc. B 103, 138—162.
- Howland R. B. and Bernstein A. 1934: Hydrogen-ion concentration as a factor in the toxicity of amines for *Amoeba proteus*. Biol. Bull. 66, 276—285.
- Kuźnicki L. 1963: Reversible immobilization of *Paramecium caudatum* evoked by nickel ions. Acta Protozool. 1 (in press).
- Ling G. and Gerard R. W. 1949: The normal membran potential of frog sartorius fibers. J. Cell. Comp. Physiol. 34, 383—396.
- Loeb J. 1898: Über die physiologische Wirkung von Alkalien und Säuren in starker Verdünnung. Pflügers Arch. Ges. Physiol. 73, 422—426.
- Pollack H. 1928: Intracellular hydrion concentration studies. III. Biol. Bull. 55, 383—385.
- Prowazek S. V. 1910: Giftwirkung und Protozoenplasma. Arch. Protistenk. 18, 221—224.
- Sorokina Z. A.: Zavisimost meždu vnutri- i vnekletočnym pH, potencialom pokoja i koncentracijej ionov  $K^+$  v poperečnopolosatom myšečnom volokne ljaguški. Citologija 3, 48—59.
- Wichterman R. 1953: The Biology of *Paramecium*. The Blakiston Company, New York — Toronto.
- Woodruff L. L. and Bunzel H. H. 1909: The relative toxicity of various salts and acids toward *Paramecium*. Am. J. Physiol. 25, 190—194.

Лаборатория цитологии одноклеточных организмов, Институт цитологии  
Академии Наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Маклина 32

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

Ю. И. ПОЛЯНСКИЙ  
G. I. POLJANSKY

## О способности инфузории туфельки (*Paramecium caudatum*) переносить отрицательные температуры

On the capacity of *Paramecium caudatum*  
to stand the sub-zero temperatures

В ряде наших предыдущих работ и исследований сотрудников нашей лаборатории (Полянский и Орлова 1948, Полянский 1957, 1958, 1959, Ирлина 1960, Суханова 1959) была показана широкая приспособляемость свободноживущих и паразитических простейших к температурным условиям среды. Теплоустойчивость простейших в широких пределах зависит от предшествующего температурного режима. В зависимости от температурных условий культивирования значительно меняется также холодоустойчивость инфузорий к 0°. Было показано (Полянский 1959), что 0° является летальной температурой для *Paramecium caudatum*, живших предварительно в условиях относительно высокой температуры (28°—29°C) и не вызывает гибели туфелек того же клона, воспитывавшихся при 4°—5°. Постепенно снижая температуру можно добиться не только переживания инфузорий при 0°, но также их нормального питания и размножения при этой температуре. В настоящее время в нашей лаборатории имеется клон *P. caudatum*, который живет при 0° уже в течение четырех лет и не обнаруживает никаких признаков депрессии. Этими опытами была выяснена причина разногласий, имевших место в литературе по вопросу о возможности переживания *Paramecium* при 0°.

Опыты с адаптацией инфузорий к 0° естественно поставили перед нами вопрос о возможности выживания инфузорий при переохлаждении ниже 0° и о соотношении переживания при переохлаждении с предшествующим температурным режимом культивирования инфузорий.

Литературные данные о способности *P. caudatum*, которая была объектом нашего исследования, переносить переохлаждение крайне скудны. Известно, что при замерзании (с образованием льда) туфельки погибают мгновенно, они не выносят образования ледяных кристаллов в цитоплазме. Возможность их переохлаждения в течение некоторого времени (без образования льда) была показана Вольфсоном (Wolfson 1935). Помещая инфузорий в капилляры

он наблюдал переживание некоторого количества туфельек при отрицательных температурах от  $-2^{\circ}$  до  $-12^{\circ}$  при экспозиции в течение 30 минут. Однако гибель отдельных инфузорий начиналась уже через 2—3 минуты с момента начала охлаждения и затем постепенно нарастала. Возможность кратковременного переживания инфузорий при  $-10^{\circ}$  была показана также Лозина-Лозинским 1948. Однако ни Вольфсон ни Лозина-Лозинский не пытались поставить в связь длительность переживания при переохлаждении с физиологическим состоянием и предшествующим температурным режимом культуры.

Задачей настоящего исследования было установить, в какой мере способность переносить переохлаждение у *Paramecium caudatum* зависит от предшествующего температурного режима, в котором происходило развитие культуры.

#### Материал и методы исследования

Для исследования использовались клоны *Paramecium caudatum*, культивировавшиеся в пробирках в минеральной среде Лозина-Лозинского и питавшиеся смесью *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus subtilis*. Эта методика подробно описана в наших предыдущих работах (Полянский 1957, 1959). Большая часть опытов была проведена с клоном S, который длительное время велся при  $0^{\circ}$ . Ответвления от этого клона были переведены в  $4^{\circ}$ — $5^{\circ}$ , далее — от этих линий в  $14^{\circ}$ — $15^{\circ}$  и, наконец, в  $28^{\circ}$ — $29^{\circ}$ . Опыты по переохлаждению были начаты после пребывания всех этих линий в указанных температурах не менее 2-х месяцев. Для поддержания культур в хорошем состоянии периодически осуществлялись пересевы в свежую среду. Ряд опытов был проведен также с линиями из  $0^{\circ}$  и из  $14^{\circ}$ — $15^{\circ}$ .

Методика опытов по переохлаждению сводилась к следующему. Инфузории засасывались в капилляр (диаметр капилляров варьировал в пределах 0,15—0,30 мм) в количестве до 50 штук. С одного конца капилляр запаивался парафином, что достигалось путем опускания самого кончика капилляра в расплавленный парафин. В таком виде парамеции подвергались охлаждению. В начале опытов для этой цели служил полупроводниковый микрохолодильник, подробно описанный и изображенный в статье Александрова, Лютовой и Фельдман 1959<sup>1</sup>. Позднее в качестве источника охлаждения мы стали применять ток охлажденного до заданной температуры спирта, охлаждение которого осуществлялось в универсальном термостате по Вонсеру типа U3 (фирма: VEB Prüfgeräte Werk Medingen Dresden).

Источником низкой температуры являлась твердая углекислота, хранившаяся в большом сосуде Дюара. Через этот сосуд проходил змеевик со спиртом. Ток охлажденного спирта от термостата пропускался через толстостенный цилиндр внутрь которого был вставлен стаканчик диаметром 4—5 см, наполненный вазелиновым маслом. Стаканчик плотно прикрывался пробкой с вставленным в нее термометром. Эта методика проста и очень удобна, так как позволяет быстро (в течение 10—15 минут) получить любую требуемую температуру (вплоть до  $-35^{\circ}$  и  $-40^{\circ}$ ) и держать ее неограниченно долгое время с точностью, превышающей  $0.1^{\circ}$ .

<sup>1</sup> См. рис. 1 и описание прибора на стр. 673 указанной работы.



Капилляры с инфузориями переносились либо непосредственно в охлажденное вазелиновое масло, либо в пустые узкие пробирки диаметром около 0.5 см, которые предварительно помещались в стаканчик с вазелиновым маслом требуемой температуры. Первый метод приводил к почти мгновенному охлаждению жидкости в капилляре. При втором, благодаря наличию воздушной прослойки, охлаждение протекало несколько медленнее (точно быстрота охлаждения нами не учитывалась). При непосредственном помещении капилляров в вазелиновое масло не удается добиться сколько-нибудь значительного переохлаждения, так как очень быстро вода в капилляре замерзает. Таким путем нам удавалось лишь получить переохлаждение при  $-3^{\circ}$ , редко до  $-5^{\circ}$ . Более низкие температуры вызывают почти мгновенное образование льда и гибель инфузорий. При охлаждении в пробирках достигается гораздо более глубокое переохлаждение. При  $-10^{\circ}$  не происходит замерзания воды в капиллярах, при  $-15^{\circ}$  примерно в 50% капилляров образуется лед, в остальных же происходит переохлаждение жидкости.

Через различные промежутки времени капилляры вынимались из холодильника и при комнатной температуре просматривались под бинокулярным микроскопом. Учитывалось количество живых инфузорий и трупов. Часть оставшихся в живых инфузорий в дальнейшем использовалась для постановки индивидуальных культур (линий). Последнее представляет существенным для решения вопроса о том являются ли парамеции перенесшие переохлаждение жизнеспособными, могут ли они продолжать размножаться или же они претерпевают необратимое повреждение, ведущее к гибели.

### Результаты экспериментов

#### Переживание инфузорий при $-3^{\circ}$ и $-5^{\circ}$

Эти опыты проводились в двух вариантах: при непосредственном помещении капилляров с инфузориями в охлажденное вазелиновое масло (мгновенное охлаждение) и при помещении их в охлажденные пустые пробирки, как это описано выше. При мгновенном охлаждении инфузорий, культивировавшихся при  $28^{\circ}$ — $29^{\circ}$  (эти линии в дальнейшем для краткости мы будем называть „теплыми“) до  $-3^{\circ}$  были получены результаты суммированные в Таблице 1.

Таблица 1

Переживание *Paramecium caudatum*, длительно культивировавшихся в  $28^{\circ}$ — $29^{\circ}$ , при мгновенном охлаждении до  $-3^{\circ}$ .

Продолжительность переохлаждения в мин.	Число опытов	Результат
1	2	Большая часть инфузорий живы. Единичные трупы (менее 10%).
2	8	Свыше 75% инфузорий погибают (трупы). У переживших движение резко замедлено.
4	5	Погибают почти все, переживают единичные особи (1%—2%).

При воздействии температурой  $-3^{\circ}$  в течение 5 минут и более ни одной инфузории не остается в живых.

Таким образом охлаждение „теплых“ парамеций до  $-3^{\circ}$  в течение двух минут вызывает гибель более половины подвергавшихся переохлаждению инфузорий. Следует заметить, что при охлаждении в течение двух минут между отдельными опытами наблюдаются значительные различия. Тогда как в одних случаях гибнут все инфузории, в других около половины остается в живых. Это, вероятно, зависит от диаметра капилляра. При большем диаметре охлаждение происходит несколько медленнее, что отражается на сроках переживания инфузорий.

Гибель инфузорий от низкой температуры сопровождается, как это было отмечено еще Ефимовым 1922, характерными морфологическими изменениями. Имеет место их набухание, они становятся яйцевидными или почти шаровидными (мы будем этот процесс в дальнейшем для краткости называть „ошариванием“). Движение резко замедляется, но не прекращается совсем. До известного предела эти изменения обратимы, как это будет показано ниже. У некоторой части „ошаренных“ инфузорий лопается пелликула и они разрушаются. Но большинство трупов сохраняются неизменными довольно долгое время.

При мгновенном охлаждении той же культуры „теплых“ инфузорий до  $-5^{\circ}$  сроки гибели еще ускоряются. После минутного воздействия погибает свыше половины инфузорий (проведено 5 опытов). При двух и трехминутном воздействии (6 опытов) ни в одном случае не было обнаружено ни одной живой парамеции. Следовательно при  $-5^{\circ}$  гибель инфузорий, сопровождающаяся характерным „ошариванием“, происходит почти мгновенно.

Таблица 2

Переживание *Paramecium caudatum*, длительно культивировавшихся в  $28^{\circ}$ — $29^{\circ}$ , при охлаждении до  $-3^{\circ}$  (в пробирках).

Продолжительность переохлаждения в мин.	Число опытов	Результат
5	2	Большинство инфузорий живы, часть „ошарилась“, трупов около 10%.
10	3	Трупов 90%, оставшиеся в живых „ошарены“.
15	4	Живых „ошаренных“ 8%—9%.
20	2	Живых „ошаренных“ 7%—8%.
25	2	Ни одной живой инфузории, только трупы.

При несколько более медленном охлаждении (в пробирках, см. выше) „теплых“ парамеций до  $-3^{\circ}$  гибель их протекает более медленно, но все же довольно быстро. Результаты этих опытов сведены в Таблице 2. В каждом отдельном опыте было взято от 50 до 150 инфузорий.

Как видно из приведенной таблицы гибель „теплых“ инфузорий при охлаждении их в пробирках начинается через 5 минут. Большинство их погибает

между 5 и 10 минутами и лишь очень небольшое количество в сильно „ошаренном” состоянии переживает до 20 минут. Из этих опытов видно, что более медленное охлаждение несколько увеличивает срок переживания инфузорий в переохлажденном состоянии.

Переохлаждение до  $-5^{\circ}$  в пробирках „теплых” линий нами не производилось.

Совершенно иную картину переживания при переохлаждении до  $-3^{\circ}$  и  $-5^{\circ}$  обнаруживают инфузории предварительно культивировавшиеся в течение 2-х месяцев и более при  $4^{\circ}$ — $5^{\circ}$  (для краткости эти линии мы будем называть „холодными”). „Холодные” линии того же клона являются неизмеримо более стойкими к повреждающему действию переохлаждения, чем линии „теплые”.

Опыты по переохлаждению до  $-3^{\circ}$  и  $-5^{\circ}$  „холодных” линий проводились в основном в пробирках по той причине, что при опускании капилляров непосредственно в вазелиновое масло не удается получить длительного (в течение нескольких часов) переохлаждения и происходит образование льда. Напротив, при более медленном охлаждении капилляров (в пробирках) жидкость с инфузориями в капиллярах можно держать в переохлажденном состоянии неограниченно долгое время.

Нами было проведено 14 опытов по переохлаждению „холодных” парameций до  $-5^{\circ}$ . В четырех опытах продолжительность переохлаждения равнялась 3 часам. При этом не погибло ни одной инфузории и не наблюдалось никаких патологических изменений их. В четырех опытах продолжительность охлаждения была увеличена до 5 часов. При этом также не погибло ни одной инфузории, но у 10%—15% наблюдалась слабо выраженная деформация — „ошаривание”. В 6 опытах продолжительность переохлаждения была доведена до 7 часов. В этой серии опытов лишь в одном из них наблюдалась гибель единичных парameций, в остальных все инфузории были живы и после переноса в комнатную температуру активно плавали. Процент „ошаренных” возрос до 25%—30%.

Опыты по более продолжительному переохлаждению „холодных” инфузорий при  $-5^{\circ}$  нами не проводились, так как проведенные эксперименты отчетливо показали, что парameции, длительно культивируемые при  $4^{\circ}$ — $5^{\circ}$ , резко повышают свою холодоустойчивость и способны без вреда переносить переохлаждение при  $-5^{\circ}$  в течение многих часов. Если учесть, что при одинаковых условиях опыта „теплые” инфузории в основной своей массе погибают при  $-3^{\circ}$  через 5—10 минут (Табл. 2), а „холодные” при  $-5^{\circ}$  живут свыше 7 часов, то из этого следует, что холодоустойчивость „холодных” превышает таковую „теплых” линий одного и того же клона более, чем в 50 раз.

Переживание инфузорий при  $-10^{\circ}$  и  $-15^{\circ}$

Все опыты с переохлаждением до  $-10^{\circ}$  и  $-15^{\circ}$  проводились путем помещения капилляров с инфузориями в узкие пустые пробирки, находящиеся в холодном вазелиновом масле (см. выше), так как непосредственное опускание капилляров в охлажденное масло всегда без исключения приводит к мгновенному замерзанию жидкости с инфузориями.

„Теплые” линии при этих условиях эксперимента (охлаждение до  $-10^{\circ}$  и  $-15^{\circ}$ ) погибают полностью за время не свыше 5 минут. Обычно уже через 3 минуты живых инфузорий почти не сохраняется, изредка наблюдаются единичные ошаренные особи с резко замедленным движением. Подметить для

„теплых” инфузорий каких либо различий в сроках переживания между  $-10^{\circ}$  и  $-15^{\circ}$  не удастся. Следует учесть, что для охлаждения жидкости в капиллярах, помещаемых в воздушную среду (пробирки) требуется некоторое время. Кроме того при открывании пробки стаканчика с охлажденным вазелиновым маслом (в которое погружены пробирки) воздух в пробирках неизбежно частично смешивается с комнатным воздухом. Поэтому можно допустить, что гибель „теплых” инфузорий происходит почти мгновенно.

Совершенно иначе при этих же температурах ведут себя „холодные” линии того же клона. Было проведено 30 опытов по переохлаждению „холодных” парамеций при  $-10^{\circ}$  и 22 опыта при  $-15^{\circ}$ . Результаты их суммированы в Таблице 3.

Таблица 3

Переживание „холодных” линий *Paramecium caudatum* при переохлаждении их до  $-10^{\circ}$  и  $-15^{\circ}$ . Цифры указывают в процентах количество оставшихся в живых

t°	Продолжительность переохлаждения (в минутах)						
	30	60	90	120	150—180	210—240	300
$-10^{\circ}$	100	100	—	57.1	35.6	15.6	0
$-15^{\circ}$	81.6	52.4	9.9	—	14.8 <sup>1</sup>	0	0

<sup>1</sup> Количество погибших инфузорий в данном опыте является несколько преуменьшенным, так как часть трупов распалась и точный учет их оказался невозможным.

Приведенные в таблице фактические данные показывают, что по сравнению с „теплыми” инфузориями холодоустойчивость „холодных” линий очень резко возрастает. При охлаждении до  $-10^{\circ}$  в течение часа гибели совершенно не происходит. Переживание значительного количества инфузорий имеет место даже после четырех часов воздействия  $-10^{\circ}$ . Более губительным оказывается действие  $-15^{\circ}$ , однако и при этой температуре имеет место выживание около 15% инфузорий в течение трех часов. Если считать, что гибель „теплых” парамеций при  $-10^{\circ}$  происходит в течение 2—3 минут, то повышение их холодоустойчивости по отношению к  $-10^{\circ}$  в результате культивирования при  $4^{\circ}$ — $5^{\circ}$  по времени возрастает примерно в 100 раз.

Нами было проведено несколько опытов по изучению холодоустойчивости линий того же клона, длительно культивировавшихся (в течение  $3\frac{1}{2}$  лет) при  $0^{\circ}$ . При переохлаждении до  $-10^{\circ}$  они обнаружили примерно такую же холодоустойчивость, как и линии, живущие при  $4^{\circ}$ — $5^{\circ}$ . После 4-х часов переохлаждения оставалось в живых 10%—15% инфузорий. Таким образом дополнительное охлаждение от  $4^{\circ}$  до  $0^{\circ}$  не привело к заметному повышению холодоустойчивости.

Несколько рекогносцировочных опытов было проведено по изучению холодоустойчивости линий, культивируемых при  $14^{\circ}$ — $15^{\circ}$ . Их способность переносить переохлаждение при  $-10^{\circ}$  оказалась немного выше „теплых” линий (из  $28^{\circ}$ — $29^{\circ}$ ), но заметно ниже „холодных” линий. Через 30 минут действия температуры  $-10^{\circ}$  на инфузорий из  $14^{\circ}$ — $15^{\circ}$  около половины их погибает, тогда как „холодные”

линии при этих условиях не обнаруживают еще никаких признаков повреждения в течение часа. Через 2 часа переохлаждения большая часть (свыше 70%) парameций из 14°—15° погибает. Только единичные особи доживают до 3 часов. Таким образом в отношении способности переносить переохлаждение, парameции культивируемые при 14°—15° оказались гораздо более стойкими, чем „теплые” линии.

О жизнеспособности инфузорий подвергшихся переохлаждению.

В результате переохлаждения перед гибелью инфузорий происходит ряд характерных изменений их морфологии, о чем уже упоминалось выше. Эти изменения, которые мы назвали „ошариванием” связаны, очевидно, с нарушением нормального водообмена. Возникает вопрос, в какой мере эти изменения обратимы? Способны ли „ошаренные” инфузории, длительное время подвергавшиеся переохлаждению, восстанавливать нормальную форму, нормально питаться и размножаться при помещении их в нормальную для жизнедеятельности температуру? Для ответа на эти вопросы была поставлена серия опытов по переносу „ошаренных” инфузорий, испытывавших длительное переохлаждение, в нормальную комнатную температуру в среду Лозина-Лозинского с обильной пищей. Эти инфузории рассаживались по-одиночке в микроаквариумы для точного учета их судьбы и темпа деления. Всего было поставлено 15 индивидуальных линий после различных сроков переохлаждения. Эти опыты дали в общем весьма однозначный результат. Все инфузории, кроме двух, через короткий срок приобрели нормальную форму и приступили к энергичному размножению. Особенно показательны опыты с инфузориями, подвергавшимися охлаждению при -15°. После часового переохлаждения при этой температуре были изолированы в микроаквариумы 4 сильно „ошаренные” особи. Из них одна погибла, а три вскоре восстановили нормальную форму и приступили к размножению со средним темпом деления при комнатной температуре (18°—20°) 1.3—1.5 деления в сутки. Аналогичный опыт с двумя линиями после двухчасового переохлаждения, когда были изолированы очень сильно деформированные, почти шаровидные, еле двигающиеся инфузории, привел к тому, что одна из них погибла, вторая же вскоре приняла нормальную форму и приступила к делению.

При менее длительных сроках переохлаждения гибели инфузорий после переноса их в комнатную температуру вообще не наблюдалось. Таким образом можно с уверенностью утверждать, что повреждение парameций, вызываемое переохлаждением, даже в тех случаях, когда оно сопровождается значительными морфологическими изменениями („ошариванием”) является обратимым и относительно легко репарируемым.

#### Обсуждение

При действии низких температур на организм следует различать два принципиально различных случая: замерзание с образованием льда и переохлаждение. Первый случай связан с образованием кристаллов, обезвоживанием и грубым механическим нарушением клеточных структур. При втором — кристаллов льда не образуется и повреждающее действие температуры не связано с механическим нарушением целостности клеточных структур. Имеется обширная литература, показывающая, что холодоустойчивость растений и животных в высокой степени зависит от физиологического состояния организма и не является

величиной постоянной, характерной для каждого вида (см. например Туманов 1940, 1960, Шмидт 1955, Лозина-Лозинский 1955, Luet and Gehenio 1940 и др.). Оказывается возможной закалка растений и животных, экспериментально повышающая их холодоустойчивость. В повышении холодоустойчивости растительных клеток особенно важная роль принадлежит сахарам (Туманов 1940). В отношении инфузорий *Paramecium caudatum* Лозина-Лозинский 1948 показал, что под влиянием ионов  $Ca^{2+}$  происходит заметное повышение холодоустойчивости.

Приходится, однако, констатировать, что по отношению к инфузориям вопрос о зависимости холодоустойчивости от условий среды и в частности от предшествующего охлаждения температурного режима, почти не затронут изучением. Относящиеся сюда немногие работы уже были рассмотрены нами выше. Между тем вопрос этот представляет значительный интерес в силу одноклеточной природы этих организмов, ибо здесь совпадают клеточный и организменный уровни устойчивости к повреждающему действию холода.

По вопросу о механизме повреждающего действия холода при переохлаждении (без образования льда) в литературе высказывались различные точки зрения. Люэ и Гехенио (Luet and Gehenio 1940), например, в своем обзоре о механизме повреждающего действия холода на клетку указывают 10 возможных причин гибели от переохлаждения. С тех пор по этому вопросу были высказаны и еще некоторые дополнительные соображения. Если попытаться сгруппировать различные указавшиеся в литературе причины повреждающего действия переохлаждения на клетку, то они могут быть, как нам кажется, объединены в следующие три группы: 1. изменение обмена веществ, связанное с нарушением координации действия различных ферментных систем, 2. нарушение проницаемости и осмотических процессов, связанных с патологическими изменениями поверхностных структур цитоплазмы, (в частности пелликулы), ведущее к нарушению водообмена, 3. изменения коллоидно-химических свойств цитоплазмы, связанные с денатурационными процессами, изменением вязкости нативных белков и их адсорбционных свойств.

Приведенные выше экспериментальные данные о зависимости стойкости *Paramecium caudatum* к переохлаждению от предшествующего температурного режима, дают основание высказать некоторые суждения о природе тех явлений, с которыми может быть связано изменение холодоустойчивости инфузорий. Как мы видели выше, действие низких температур при переохлаждении убивает инфузорий „теплых” линий чрезвычайно быстро, в течение немногих минут. Эта почти мгновенная гибель сопровождается резкими морфологическими изменениями — „ошариванием”, вакуолизацией цитоплазмы, резким замедлением ресничного движения. Трудно допустить, чтобы все эти изменения, протекающие на очень коротком отрезке времени и приводящие к гибели, были связаны с нарушением координации различных сторон метаболизма и обуславливающих его ферментных систем. Гораздо вероятнее предположить, что имеет место непосредственное повреждающее действие низкой температуры на белковый субстрат клетки. Происходящие при этом глубокие изменения нативных белков, связанные, возможно, с денатурационными процессами, отмешиванием воды и изменением адсорбционных свойств и являются непосредственной причиной летального действия переохлаждения. Лозина-Лозинский 1948, изучав-

ший причины смерти инфузорий при переохлаждении, также считает, что изменение коллоидного состояния протоплазмы имеет при этом важное значение.

Если эти соображения справедливы, то из них следует, что повышение стойкости к переохлаждению должно быть связано в первую очередь с изменениями коллоидно-химического, субстанционального характера белков протоплазмы, повышающими их стойкость к повреждающему действию низких температур.

Существенную роль в повреждающем действии низких температур на инфузорий играют, возможно, и изменения свойств проницаемости пелликулы, нарушающие нормальный водообмен. На эту сторону влияния отрицательных температур обратил внимание Лозина-Лозинский 1948. Изменение свойств пелликулы можно рассматривать, как одно из проявлений влияния переохлаждения на белковый субстрат протоплазмы.

Изложенные выше представления хорошо согласуются с некоторыми цитофизиологическими исследованиями по повышению холодоустойчивости (закалке) растительных клеток. Александров, Лютова и Фельдман 1959 на основании обширного экспериментального материала по изучению сезонных изменений холодоустойчивости и теплоустойчивости растительных клеток различных высших растений приходят к выводу, что в основе явлений „закалки” лежат неспецифические изменения протоплазматических белков в направлении их денатурации. Сулак дзе 1960, изучавший явление закалки у цитрусовых, указывает, что при холодной закалке происходит повышение вязкости плазмы и понижение дисперсности биокolloидов. Эти процессы вместе с тем связаны с повышением кислотности (рН) и окислительных свойств (гН) клетки.

Наши прежние исследования (Полянский 1957) привели нас к выводу о том, что изменение теплоустойчивости инфузорий связано в первую очередь с обратимыми изменениями (вероятно денатурационного характера) белков цитоплазмы. Изложенные выше факты и соображения, касающиеся холодоустойчивости инфузорий, заставляют предположить, что я это свойство связано с субстанциональными изменениями белков протоплазмы.

Разумеется субстанциональные изменения белков не могут протекать изолированно от метаболизма клетки. Поэтому ближайшей задачей в изучении температурных адаптаций (как к высоким так и к низким температурам) у простейших, мы считаем исследование процессов обмена веществ у *Protozoa*, адаптированных к различным температурам.

### Выводы

1. На клональном материале *Paramecium caudatum* изучалось действие переохлаждения в зависимости от предшествующего температурного режима. Переохлаждение инфузорий осуществлялось в капиллярах.

2. Инфузории, предварительно длительно культивировавшиеся при 28°—29° („теплые” линии) обнаруживают очень малую холодоустойчивость. При быстром охлаждении до -3° или -5° они погибают в течение 4—5 минут. При более медленном охлаждении до той же температуры гибель происходит через 15—20 минут. Переохлаждение до -10° или -15° убивает инфузорий „теплых” линий в течение 1—2 минут.

3. Парамеции того же клона, предварительно культивировавшиеся при 4°—5° („холодные” линии) обнаруживают по сравнению с „теплыми” гораздо

более высокую холодоустойчивость. 7-часовое переохлаждение до  $-5^{\circ}$  их не убивает. „Холодные” линии переносят переохлаждение при  $-10^{\circ}$  до 4-х часов, при  $-15^{\circ}$  до трех часов. Холодоустойчивость „холодных” линий по срокам переживания при переохлаждении по сравнению с „теплыми” возрастает в 50—100 раз.

4. Линии культивируемые при  $14-15^{\circ}$  в отношении холодоустойчивости занимают промежуточное положение между „холодными” и „теплыми”.

5. Обсуждается вопрос о природе изменений, вызывающих изменение холодоустойчивости. Высказывается предположение, что оно связано с субстанциональными коллоидно-химическими изменениями протоплазматических белков.

#### SUMMARY

1. In *Paramecium caudatum* the noxious effect of over-cooling with special reference to the previous temperature regime of cultivation was studied.

2. The clones of *Paramecium caudatum* which have been previously cultivated at relatively high temperatures  $28-29^{\circ}$  („warm lines”), appeared to have a very low cold-resistance. When rapidly cooled at temperatures ranging from  $-3^{\circ}$  to  $-5^{\circ}$ , these ciliates died within 4—5 minutes and within 15—20 minutes if cooled slowly. Over-cooling at  $-10^{\circ}$  or  $-15^{\circ}$  killed the „warm lines” within 1—2 minutes.

3. Paramecia of the same clone cultivated at a relatively low temperatures of  $4-5^{\circ}$  („cold lines”) were found to possess a much higher cold-resistance than the „warm” ones. Even 7 hours of over-cooling at  $-5^{\circ}$  failed to kill these ciliates. The animals were kept alive for 4 hours at  $-10^{\circ}$  and for 3 hours at  $-15^{\circ}$ . The resistance to over-cooling at  $-10^{\circ}$  and  $-15^{\circ}$  was 50—100 times stronger in the „cold lines” than in the „warm” ones.

4. The clones cultivated at  $14-15^{\circ}$  occupy an intermediate position with respect to their resistance against over-cooling.

5. The lethal effects of over-cooling and the nature of the cytophysiological processes developed during the changes in cold-resistance were discussed in detail. It is put forward that these phenomena are involved by some fundamental changes in protein colloids of cytoplasm.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Александров В. Я., Лютова М. И., Фельдман Н. Л. 1959: Сезонные изменения устойчивости растительных клеток к действию различных агентов. Цитология 1, 672—691.
- Ефимов В. В. 1922: Вымерзание и переохлаждение простейших. Арх. Русск. протистол. общ. 1, 153—168.
- Ирлина И. С. 1960: Изменение теплоустойчивости некоторых свободноживущих простейших под влиянием предшествующего температурного режима. Цитология 2, 227—234.
- Лозина-Лозинский Л. К. 1948: Влияние солей на холодоустойчивость инфузорий и причины смерти при охлаждении. Журн. общ. биол. 9, 441—453.
- Лозина-Лозинский Л. К. 1955: Жизнеспособность и анабиоз при низких температурах у животных. Добавление к монографии П. Ю. Шмидта: Анабиоз, 381—433.
- Luet V. and Gehenio P. 1940: The mechanism of injury and death by low temperature. A Review. Biodynamica 3, 33—99.
- Полянский Ю. И. 1957: Температурные адаптации у инфузорий. I. Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* от температурных условий существования. Зоол. журн. 36, 1630—1646.



- (Полянский Ю. И.) Poljansky G. 1958: Experimental investigation of temperature adaptations of infusoria. XV Intern. Congr. of Zoology, Sect. IX, Paper 26, 1—3.
- Полянский Ю. И. 1959: Температурные адаптации у инфузорий. II. Изменение теплоустойчивости и холодоустойчивости *Paramecium caudatum* при культивировании при низких температурах. Цитология 1, 714—727.
- Полянский Ю. И. и Орлова А. Ф. 1948: Об адаптивных изменениях и длительных модификациях у инфузорий *Paramecium caudatum* вызванных действием высоких и низких температур. Докл. Акад. Наук СССР, 59, 1025—1028.
- Сулакадзе Т. С. 1960: Внутриклеточные изменения при закаливании растений к низким температурам. Сборн. Физиология устойчивости растений (Труды Конференции), 225—228.
- Суханова К. М. 1959: Температурные адаптации у паразитических простейших амфибий. Цитология 1, 587—600.
- Шмидт П. Ю. 1955: Анабиоз. Изд. Акад. Наук СССР, Москва—Ленинград.
- Туманов И. И. 1940: Физиологические основы зимостойкости культурных растений. Сельхозгиз, Ленинград.
- Туманов И. И. 1960: Современное состояние и очередные задачи физиологии зимостойкости растений. Сборн. Физиология устойчивости растений (Труды Конференции), 5—17.
- Wolfson Ch. 1935: Observations on *Paramecium* during exposure to sub-zero temperatures. Ecology 16, 630—639.



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

Leszek KUŹNICKI

## Recovery in *Paramecium caudatum* immobilized by chloral hydrate treatment

Powrót *Paramecium caudatum* do normy  
po immobilizacji wodzianem chloralu

Alverdes 1922 observed that in *Paramecium caudatum* after a two days long exposure to 0.1% solution of chloral hydrate, immobilization of the ciliate occurs as result of loss of body cilia. After the transfer of those deciliated infusoria into tap water, regeneration of cilia and resumption of the normal swimming occurs.

This phenomenon was not extensively investigated by Alverdes. He limited his study to observation of the behaviour of the caudal cilia in the course of regeneration and to some considerations upon the problem of their origin. This limitation of the subject seems to be the reason why Alverdes' observation escaped attention of later authors. In the study of the chloral hydrate action upon *P. caudatum*, its deciliating or even immobilizing properties were not stated.

Just lately Grębecki and Kuźnicki 1961 confirmed Alverdes' observations and found the optimal conditions for evoking the mass occurrence of the immobilization effect. They also stated that immobilization with chloral hydrate fails to involve pathological changes of the body shape.

In the purpose to estimate the practical value of this treatment, the percentage of *Paramecia* able to recover after immobilization had to be determined. For this purpose a series of experiments were performed, paying a special attention to the state of the motion apparatus because with the immobilization and recovery after chloral hydrate treatment the interesting phenomenon of primary loss and subsequent regeneration of cilia is connected. The study of this process — as it seems — may introduce some interesting data to the discussion on function and on morphogenesis of the locomotory apparatus.

### Medium conditions and the process of re-normalization

Experiments were carried out on a clone of *P. caudatum* cultivated on the powdered milk nutrient. Ciliates were immobilized with 5 mM solution of chloral hydrate in samples containing about 100 individuals. Each expe-

periment was repeated 20 times. After 48 h, the number of immobilized individuals was established. It amounted in average 80%. The dead individuals were removed from the sample. In those conditions motile individuals were not stated. Subsequently the ciliates were rinsed 4 times, at 5 min. intervals, with the medium of culture diluted 1:1 with distilled water. This treatment resulted in the 10000-fold dilution of the initial solution of chloral hydrate. The period of time between the treatment and the start of movement in 50% of individuals was determined; also the percentage of ciliates found living in 24 h after rinsing was calculated. It proved to be comparatively high, amounting about 85%.

The influence of the character of liquid used for rinsing was tested. The ciliates of the next experiments were rinsed with: tap water, or 2 mM solution of  $\text{CaCl}_2$  in distilled water. Calcium was chosen on account of the regulating action of its ion upon the cortical cytoplasm layer of the cell (see Heilbrunn 1952). The results proved that the re-normalization process in the ciliates rinsed in the culture medium (diluted with water 1:1) and in tap water were similar, but a slight favourable influence of  $\text{CaCl}_2$  solution was stated. The results of those experiments are represented in the Table 1.

Table 1

Course of re-normalization processes in *P. caudatum* immobilized with 5 mM solution of chloral hydrate for 48 h depending on rinsing medium

Character of rinsing medium	Mean time of start of motion in 50% of individuals	% of individuals returning to norm after 24 h
Culture medium diluted with water 1:1	7 h 40'	84.6 ± 4.3
tap water	8 h 10'	82.3 ± 3.6
$\text{CaCl}_2$ 2 mM	6 h 40'	89.7 ± 4.5

Alverdes 1922 suggested a certain favourable influence of the rise of temperature upon the re-normalization of the immobilized individuals. The experiments of this study proved that the rise of temperature accelerates the restitution of the motor functions but reduces the percentage of recovering ciliates. Those results are illustrated in the Table 2. The procedure was the same as in the former experiments but for all 3 temperatures (15°, 20°, 25°) 10 samples rinsed with tap water were analyzed. The data presented in the Table 2 prove that the high percent of viable individuals is obtained when the immobilization is performed in a temperature not higher than 20°.

Table 2

Influence of temperature on the course of re-normalization in *P. caudatum* immobilized for 48 h with 5 mM solution of chloral hydrate (ciliates are rinsed with tap water)

Temperature	Mean time of start of motion in 50% of individuals	% of individuals returning to norm after 24 h
15°	7 h 20'	88.6 ± 3.9
20°	4 h 45'	83.1 ± 4.2
25°	3 h 40'	66.7 ± 5.6

The depressing action of chloral hydrate concerns not only the suppression of movement as result of loss of cilia but also it exerts influence upon other vital functions. In immobilized individuals, the reduction of the number and of size of the food vacuoles occurs. Goldschmied-Herrmann 1935 stated that in *Paramecium* the cyclosis is inhibited after a prolonged action of chloral hydrate. This observation was confirmed. In the immobilized individuals, the food vacuoles are excreted before they perform their full turn. Examination of their content showed that bacteria were not digested. 24 h after the moment of rinsing the digestion proceeds like in the normal individuals again. In Table 3 results are shown illustrating the changes in the rythm of the contractile vacuoles. The rythm recovers to its normal state 7 h after rinsing. The results represented in the Table 3 are the mean values from 10 successive contractions of the anterior vacuole observed in 10 individuals.

Table 3

Rythm changes of contractile vacuoles in *P. caudatum* after 48 h in 5 mM solution of chloral hydrate and in the course of re-normalization process after rinsing in tap water

Rythm of contractile vacuoles in seconds				
Control	Immobilized ciliates	After rinsing		
		after 1 h	after 7 h	after 18 h
11.6 ± 3.6	44.4 ± 16.2	54.5 ± 21.4	12.8 ± 4.1	12.4 ± 3.4

The decisive indication that the immobilization with chloral hydrate is followed by a full regulation of vital processes was the analysis of division in ciliates. The rate of division in the milk medium culture from which the experimented ciliates originated, was fluctuating in the limits 1.3—1.4 divisions in 24 h. After the transfer to the chloral hydrate solution, the full inhibition of the divisions occurred and lasted for 24 h from the moment of rinsing. After this period, 100 individuals were isolated and placed in separate drops of the

culture medium. Divisions started 64—72 h after rinsing. Their rate (1.8 divisions in 24 h) was at first slightly higher than in the control ciliates (1.3). The full recovery to the normal rythm i.e. 1.2—1.4 divisions in 24 h, occurred within 4 days. A culture was initiated from 5 individuals and observed for 30 days; no differences in any respect were stated as compared with the non-treated (non-immobilized) animals.

All those experiments permit to draw a final conclusion that immobilization of ciliates with chloral hydrate is a mass phenomenon fully reversible after rinsing.

#### Loss and restitution of the movement apparatus

Ciliates immobilized with chloral hydrate are fully or nearly so deprived of the body cilia. Cilia of the peristomal groove are observed functioning. The process of loss and of regeneration of the ciliary apparatus was observed in microscope at 1 h intervals on samples immobilized in 4—5 mM chloral hydrate solution. In some specimen the first signs of loss of cilia are observed after 14—16 h, but as a mass process it occurs only after 24 h.

It should be stressed that the loss of cilia is preceded by a fall of velocity of movement, but without other motor disturbances. The further slowing of swimming is connected with the loss of cilia. In the control sample, the velocity of movement amounted in average 840—950  $\mu$ /sec, and in the sample of ciliates in which loss of cilia was occurring, it amounted 125—250  $\mu$ /sec. So the first effect of the chloral hydrate action is only the slowing of movement and the subsequent result is the direct damage of the ciliary apparatus.

Loss of cilia begins in the anterior part of the body. At first single cilia are detaching, and — what is most interesting — they keep their ability to move, i.e. their functional possibilities. In the initial period of immobilization, the factor promoting and even involving the loss of cilia is the rubbing of the ciliate against any solid body surface. Yet in a later stage, "a spontanik" loss of cilia is observed.

The observation in the light microscope gives an impression that cilia detach together with kinetosomes. At the vessel bottom a great number of dropped cilia are found when immobilization of ciliates was carried out. The presence of multitude of undamaged cilia speaks against the supposition that cilia break and crumble out. Cilia with no terminal swelling were not stated. Fig. 1 represent the successive stages of the loss of cilia. As mentioned above, the process begins in the anterior part of the body but a distinct axial gradient can scarcely be stated. The ciliary apparatus is becoming scarce on the whole surface of the body except the caudal zone. This process intensifies with time, till bald spaces appear with tufts of cilia between them. In the concentration 5 mM is used he above picture appears between the 26th and 32th hour of experiment. It is interesting that in spite of a considerable loss of the motion organelles no visible disturbances of movement are observed except for some slowing of progressive swimming.

The ciliate C in Fig. 1 represents the immobilization phase when the individual is in most cases laying at the bottom although it is still able to swim slowly. In this stage, only small tufts of cilia or even single cilia may be observed in the anterior body part. In the posterior part cilia are more

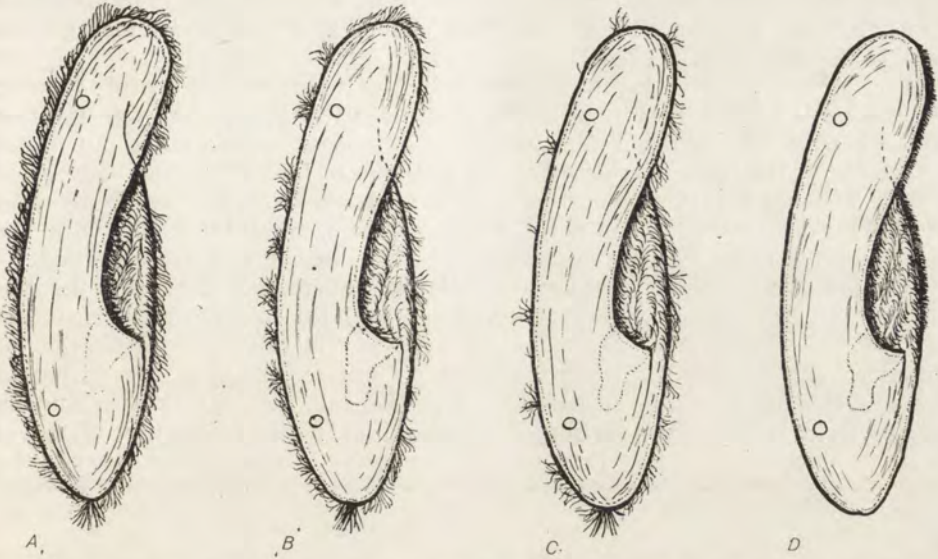


Fig. 1. Successive stages of the loss of body cilia in *P. caudatum* exposed to chloral hydrate, from the complete unimpaired ciliature (A) to the full deciliation of the body (D). Drawing after microscopic pictures presented by living specimens

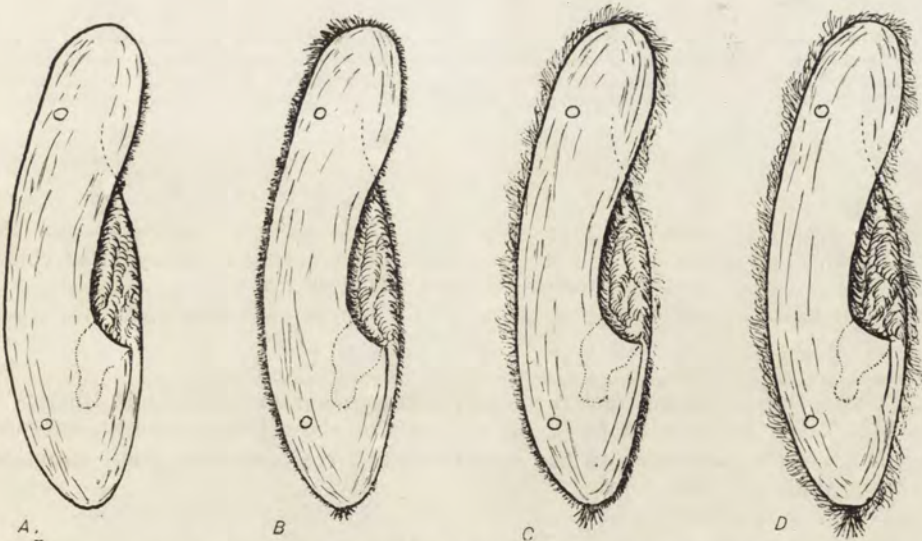


Fig. 2. Successive stages of regeneration of ciliature in *P. caudatum* after rinsing, from an individual completely deprived of its body cilia (A) to the full restoration of the motor apparatus (D). Drawing after microscopic pictures presented by living specimens

numerous but reduction in the caudal tuft can be observed. In the immobilized forms the full loss of cilia occurs, only the cilia of the peristomal groove remain unimpaired (Pl. I 2—4).

Regeneration of cilia begins in some individuals before the 3 h. after rinsing. Its course is shown in Fig. 2 and Pl. I 5—6. Cilia appear on the anterior of the body as a tiny down. Presumably this process starts earlier but is not detectable in the light microscope. Cilia of the anterior part of the body grow faster. The growth of the posterior cilia is delayed, only the regeneration of the caudal tuft goes distinctly ahead of them. Simultaneously with the appearance of cilia, the first not always effective movements are observed.

Regeneration of the ciliary apparatus lasts in average 2—3 h. from the moment when its beginning was observed in the light microscope. Restitution of the visible structures results not at once in the full re-normalization of function. The ciliates cannot swim normally not only during the period of regeneration but even for some time after its full accomplishment. Sudden retreat (typical avoiding reaction of Jennings), changes of direction of movement and increase of rotary movements are observed. Dependence between the

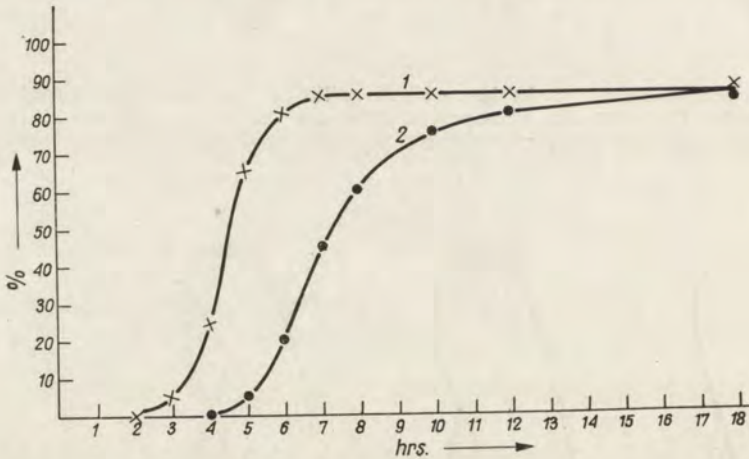


Fig. 3. Start of movement and its re-normalization during recovery after chloral hydrate treatment (0—18 hrs after rinsing)

1 — % of individuals performing any movements; 2 — % of individuals performing normal movements

start and the re-normalization of movement in a mass sample is illustrated in Fig. 3. It may be stated that in the case of the ciliates immobilized with chloral hydrate formation of the structures and restoration of their functions precede their co-ordination.

#### Discussion

Results reported here, in connection with the results of the previous study (Grębecki and Kuźnicki 1961), indicate that in *Paramecium caudatum* treated with chloral hydrate, a reversible immobilization may be evoked



without pathological alteration of the cell. In spite of the full loss of body cilia and some symptoms of poisoning, ciliates show an ability of complete restitution of their motor apparatus and of life functions, after rinsing. Immobilizing of *P. caudatum* with chloral hydrate may be recommended as a method as well for the study of physical and physico-chemical properties of the protozoa cell as for the investigations on morphogenesis and functioning of ciliary apparatus. The immobilizing action of chloral hydrate proved to be highly specific. As follows from the observation of other ciliates (*Paramecium aurelia*, *P. bursaria*, *Colpidium colpoda*, *Spirostomum ambiguum*, *Tetrahymena pyriformis*), the deciliating action of this compound without simultaneous deformation of the cell, was stated only in *P. aurelia* and *P. bursaria*. For *P. aurelia*, the best results were found after application of 5—6 mM solution of chloral hydrate for 48 h, while for *P. bursaria* — the concentration of 3.5—5 mM applied for the same time, was effective. The immobilizing action of chloral hydrate seems to be limited to the genus *Paramecium*.

A special discussion deserves the loss of cilia evoked by solutions of chloral hydrate, and the subsequent restoration of ciliature, which may be important for the present theories of morphogenesis following from the described facts.

As it is known, Ch at t o n et L w o f f 1935 put forward a theory limiting the origin of kinetosomes exclusively to auto-reproduction. The genetic continuity of kinetosomes raised by L w o f f 1950 to the range of a rule, evoked no objections for many years. Just lately E h r e t and P o w e r s 1959 suggested a concept that kinetosomes arise de novo every time from "progenitor organelles, microsomal in size".

The observations of this study in the light microscope indicate that cilia detach probably together with kinetosomes. If it is so indeed, regeneration of cilia after immobilization would be a strong support for E h r e t and P o w e r s concept. Nevertheless the fact of detachment of cilia together with kinetosomes cannot be considered as proved in this study especially after the results of P i t e l k a and P á r d u c z 1962, who studied the deciliated areas in *P. multimicronucleatum* after a treatment with  $\text{NiSO}_4$ . The light microscope pictures after Gelei's method suggested the full absence of kinetosomes in the deciliated areas. Quite different image was that from the electron microscope. Cilia proved to be detached by fracture near the distal part, and kinetosomes like the whole silverline system remain unimpaired. The theory of detachment of cilia together with kinetosomes needs control by the electron microscopic study.

The scope of the present paper does not embrace the analysis of changes occurring in the colloids of surface structures in ciliates, involving detachment of cilia after a prolonged action of chloral hydrate. At any rate, the fact that detached cilia keep for a short time their ability of performing movements suggests that the essential cause of detachment must be looked for in the cortical layer of the cell and not in the cilia themselves.

It may be stated that a prolonged action of chloral hydrate is not disturbing the co-ordination of function of the ciliary apparatus. It is a peculiar fact that the loss of cilia concerns only some places and forms irregular areas. Yet the ciliates even with an irregularly deficient ciliature keep their ability of a co-ordinated and effective swimming. Immobilization influenced by chloral

hydrate is the consequence of a total or nearly total loss of cilia, and is not the result of suppression of propagation of impulses or of their co-ordination.

The ciliary waves may be observed since the earliest moment of regeneration of the motor apparatus i.e. when cilia form a scarcely discernable down in the anterior part of the cell. The occurrence of metachronal impulses is not synonymous with co-ordination in the motoric apparatus as a whole. The metachronal impulses appear since the early stages of regeneration but they are not regular (which may be stated in the picture of the ciliary waves), so this rythm cannot be the factor ensuring the co-ordination of movement. Motoric disturbances remain even then, when the microscopic pattern of the ciliature seems already normal, confirming the theory that restoration of functional structures precedes the mutual co-ordination of their work. This phenomenon seems not to be the consequence of the negative influence of a prolonged stay in the chloral hydrate solution because then the motor disturbances should appear before all in the course of the immobilization process.

These observations contribute some interesting moments to the actually discussed subject of propagation of impulses and of the character of metachronal movement in ciliates. As is known, presently two concepts are considered: according to the first (see P á r d u c z 1958, 1962) the metachronal impulses are propagated like the impulses in the nerve cell and cilia play no part in their origin. The second concept (S l e i g h 1956, 1957) ascribes to the cilia the essential role in propagation of impulses.

Observations of behaviour of the motor apparatus in the individuals immobilized with chloral hydrate support the view of P á r d u c z 1962, that in *Paramecium* the cilia themselves play no part in formation and propagation of metachronal impulses. It may even be stated that lack of a considerable number of cilia is not disturbing the function of the others. Otherwise the character of swimming during the course of re-normalization seems to indicate that in ciliates the most indispensable factor of resuming the co-ordination in the whole ciliary apparatus is the full regeneration of cilia.

### Summary

*Paramecium caudatum* immobilized with chloral hydrate and subsequently rinsed shows the ability of re-normalization of all disturbed vital functions. Restitution of motion is the result of the regeneration of body cilia. Treatment with chloral hydrate may be recommended as a method of study of morphogenesis and action of the motor apparatus. This method proved to be effective only for the genus *Paramecium*. The genetic continuity of kinetosomes, co-ordination and propagation of metachronal impulses are discussed in connection with the behaviour of the ciliary apparatus in the course of the reversible immobilization.

### STRESZCZENIE

*P. caudatum* immobilizowane wodzianem chloralu, a następnie przepłukane, wykazują zdolność do renormalizacji wszystkich funkcji życiowych. Restytucja ruchu zachodzi w wyniku regeneracji rzęsek somatycznych. Stosowanie wodzianu

chloralu można więc zalecać jako metodę badania morfogenezy i funkcjonowania aparatu ruchowego. Czynniki ten okazał się jednak efektywny tylko w stosunku do wymoczków z rodzaju *Paramecium*. W związku z zachowaniem się aparatu rzęskowego w trakcie odwracalnej immobilizacji dyskutowany jest problem genetycznej ciągłości kinetosomów oraz koordynacji, przewodzenia i rozchodzenia się impulsów metachronicznych.

## REFERENCES

- Alverdes F. 1922: Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. Arb. a. d. Geb. d. exp. Biol. 3, 1—133.
- Chatton E. et Lwoff A. 1935: Les Ciliés apotomes. I. Aperçu historique et général; étude monographique des genres et des espèces. Arch. Zool. exp. et gén. 77, 1—453.
- Ehret C. F. and Powers E. L. 1959: The cell surface of *Paramecium*. Intern. Rev. Cytol. 8, 97—133.
- Goldschmied-Herrmann A. 1935: Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Narkotika auf Paramaecien. Biol. Generalis 2, 255—276.
- Grębecki A. and Kuźnicki L. 1961: Immobilization of *Paramecium caudatum* in the chloral hydrate solutions. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 459—462.
- Heilbrunn L. V. 1952: On Outline of General Physiology. 3rd ed. W. B. Saunders Co, Philadelphia.
- Lwoff A. 1950: Problems of Morphogenesis in Ciliates. Wiley and Sons, New York.
- Párducz B. 1958: Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten, VII. Das Problem der vorbestimmten Leitungsbahnen. Acta Biol. Ac. Sci. Hung. 8, 219—251.
- Párducz B. 1962: On the nature of metachronal ciliary control in *Paramecium*. J. Protozool. 9 (Suppl.), Abstr. 95.
- Pitelka D. R. and Párducz B. 1962: Electron-microscope observations on paralyzed *Paramecium*. J. Protozool. 9 (Suppl.), Abstr. 2.
- Sleigh M. A. 1956: Metachronism and frequency of beat in the peristomal cilia of *Stentor*. J. Exp. Biol. 33, 15—28.
- Sleigh M. A. 1957: Further observations on co-ordination and the determination of frequency in the peristomal cilia of *Stentor*. J. Exp. Biol. 34, 106—115

## EXPLANATION OF THE PLATE I

Ciliature of *Paramecium caudatum* during the chloral hydrate immobilization and recovery. Rapid fixation and staining after Párducz technique

- 1: Body cilia in a normal individual.
- 2: „Dorsal” view of a immobilized specimen. The aboral side of the body is completely deciliated.
- 3: „Ventral” view of a immobilized specimen. On the oral side of the body cilia remain unimpaired only in the peristomal groove.
- 4: „Ventral” view of a immobilized specimen. Undamaged cilia of the peristomal groove may perform normal metachronal waves.
- 5: An early stage of the regeneration of cilia after rinsing.
- 6: A later stage of the regeneration of ciliature.





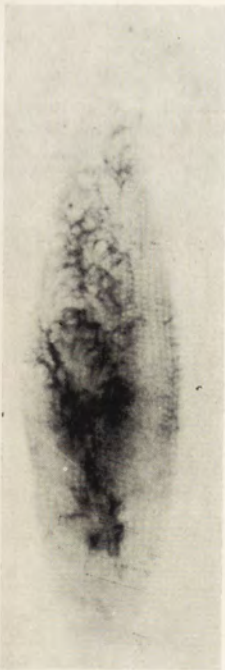
1



2



3



4



5



6

L. Kuźnicki

auctor phot.



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

Marek DOROSZEWSKI

## Some features of the ciliary activity in *Dileptus*

O pewnych właściwościach ruchu rzęskowego u *Dileptus*

The uniformity of important features of the ciliary movement among the ciliates can be assumed only from a general standpoint. As a matter of fact we have to do with more or less clearly marked differences in this domain. The description of the most important characteristics of the ciliary movement as for instance the direction of the wave propagation was quite recently done only for a few representatives of protozoa as *Opalina* (Okajima 1954), *Paramecium* (Párducz 1954), *Stentor* (Sleigh 1957). Main differences in the pattern of the ciliary movement should be taken in account for explanation of its mechanism and co-ordination. On the other hand we have to do with a marked local differentiation of the areas of the ciliary activity within the single ciliate cell. As yet no separate study was devoted to the ciliary movement in *Dileptus*. The main purpose of the present study is to determine the functional differentiation within the various parts of the cell surface of *Dileptus* as well as to follow the main directions of the propagation of the metachronic wave in the ciliate.

As far as the morphological basis of the ciliary activity in *Dileptus* is concerned, the reader can be referred to the papers of Vissher 1927, Peshkovsky 1927, Dumont 1961. The behaviour of this ciliate was described by Vissher 1923, Dragesco 1962, Jones and Beers 1953.

I wish to express my sincere thanks to dr. S. Dryl for reading the manuscript and to Miss K. Golińska for her technical assistance during the course of work and for the execution of the drawing.

### Material and methods

As in the previous study (Doroszewski 1962), the observations were made on the representatives of species provisionally classified as *Dileptus anser* O. F. M. cultivated by the methods already described, fed on *Tetrahymena* and *Colpidium*.

Single specimens were observed in water chambers surrounded by the paraffin oil. For this purpose the phase contrast equipment or the dark field condenser were used. The low power objectives and the oil immersion of 60× magnification were used. During the observations the ciliates were placed in

the culture medium or in the buffer solution of Dryl 1959.

The observations were carried out in the room temperature 20°—22°, yet some additional records were done in the refrigerator chamber in the temperature of 4° and of 6°C.

Some observations were recorded on 16 mm movie-film. The method of the rapid fixation of Párducz was used (Pl. I 1, 3). In addition the structure of the ciliary apparatus was explored by means of the nigrosin negative staining (Pl. I 2).

## Results

### The proboscis cilia

Even a quite superficial examination of *Dileptus* shows a remarkable differentiation of the zones of the ciliary movement. Especially the distinct metachronal waves appearing on proboscis may be easily observed under microscope. These waves are located upon the sector of proboscis next to the cytostome and are propagated in the area between the labial ring surrounding the cytostome and the tip of proboscis.

When ciliate is resting one can observe the contrast between the clearly marked ciliary waves on the proboscis and less pronounced pattern of the movement upon the rest of the body.

The direction of the ciliary waves on the proboscis may be changed in few seconds or even more quickly. The waves can be propagated from the tip of the proboscis to the cytostome or in the reverse direction. In the state of excitation these waves are most easily observed as it was already stated elsewhere (Doroszewski 1962). During the searching movements of the proboscis the waves are generated one after another. In the feeding individual of *Dileptus* the small ciliates serving as food are killed by the trichocysts and are transported by the water current of the proboscis cilia to the proximity of the cytostome, as it was stated by Dragesco 1962. During the normal progressive motion the cilia on proboscis are specially difficult to observe because of the quick movement of the ciliate.

The sector of the distinct metachronal waves on the proboscis correspond to the zone of "feeding cilia" described by Dumont 1961 and the undulatory movements were directly observed and recorded on the movie film (Pl. I 5). These waves can also be easily detected by the method of rapid fixation (Pl. I 1, 3).

### The cilia surrounding the cytostome

The outer part of the cytopharyngeal complex consists of the naked labial ring surrounding the cytostomal aperture (Fig. 1).

Around this ring are situated some longer cilia, which show remarkably slower movement than cilia from other parts of body. They form no structural nor functional continuity with the rows of feeding cilia.

### The caudal cilia region

Another region of differentiated ciliary activity is the caudal one. It consists of the cilia situated upon the body surface between the rear sprout and the posterior contractile vacuole. The movement of these cilia is also remar-



kably slower than upon the rest of the body. The observation of Jones 1951 was confirmed that near the caudal region is situated the area of attachment to the bottom of the pool by means of a mucous substance. It was also visible that during the slow rotating forward motion the caudal end is drawn to the surface of the slide or to the bottom of Petri dish.

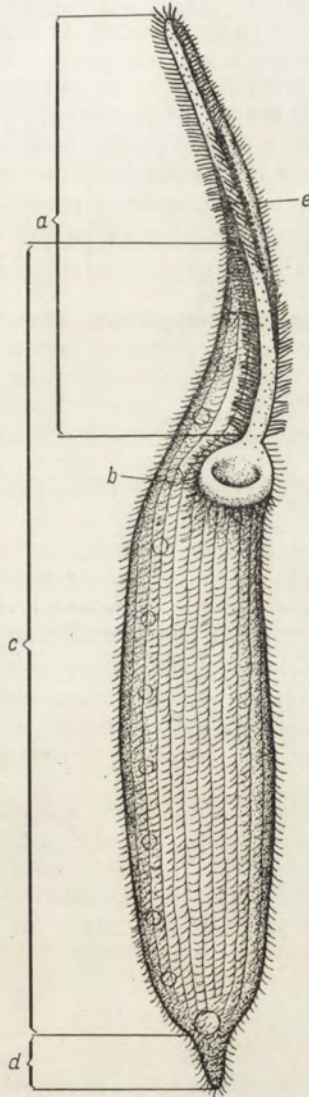


Fig. 1. The ciliary apparatus of *Dileptus*

a — cilia on the cytostomal region of proboscis. b — cilia surrounding the cytostomal ring;  
c — cilia upon the body surface; d — caudal cilia; e — membranellae

### The cilia of the body surface

The rest of the body surface, including the major part of the dorsal sector of proboscis, is covered by the comparatively uniform ciliature. The uniformity is however not absolute even in this case. There are differences both in the length of the cilia as also in the density of their arrangement and the distances between the ciliary rows. The observations on the ciliary waves in the living individual and in the fixed preparations are more difficult to perform as in the case of *Paramecium* because of comparatively shorter length of cilia in *Dileptus*.

The feeding individual while it rests on the surface of the slide executes its searching movements by means of proboscis. In this position the cilia are moving slowly and the ciliary waves on the body surface were not observed. The total stopping of the body cilia was observed in the rare cases, but it can also occur during the normal movements of proboscis.

Special attention was paid to the propagation of the metachronal waves during the normal forward motion of the ciliate. The spiraling may be either clockwise or counter clockwise and the direction of the spin is easily subjected to alternations. The metachronal ciliary waves observed during the forward motion can show different patterns and are by no means uniform. During the metachronal motion of cilia the distinct ciliary waves may be not visible. The clear occurrence of the waves is connected with the high degree of integration of metachronal mechanism. The sequence of the phases of the cycle of the ciliary beat may be not synchronous to each other in the neighbouring rows. It was observed that the metachronal motion is not necessarily connected with the distinct pattern of the waves. During the forward motion of the ciliate the waves were propagated from the anterior to the posterior end of animal, i.e. in the observed cases the main direction of the wave propagation was the same as that of the resultant direction of the ciliary effective strokes. However the evidence is not sufficient as to treat it as a general rule for *Dileptus*.

Just before the ciliary reversion takes place, the pattern of the metachronal waves changes. This change is characterized by a general lack of co-ordination (Pl. I 6). During this period the waves seem to be broken or extinguished.

During the backward motion the ciliary waves appear to propagate from the posterior end to the anterior end of body. In this instance the wave originates near the posterior end of the ciliate. In both cases i.e. during the backward as well as during the forward movement the direction of the wave propagation is usually the same as the resultant direction of the effective strokes.

### Discussion

Let us compare the main characteristic features of the ciliary activity of *Dileptus* with that of *Paramecium*. The cytostomal sector on proboscis of *Dileptus* in some respects may be compared with the peristomal region in *Paramecium*. It is well known that one of the main places of the wave origination in *Paramecium* is the peristomal area and especially its rear part. As stated above in the case of *Dileptus*, the most active region for originating

the ciliary waves is the proboscis. The main direction of the wave propagation in *Dileptus* is the backward one during the forward movement and the reverse is true in case of *Paramecium*. The higher degree of co-ordination and integration of the waves in these regions can depend to a certain extent on the greater susceptibility of these regions to mechanical and chemical stimuli. The papers of S e r a v i n 1962 should be mentioned in this connection as drawing the attention to the role of gradient.

The irregular occurrence and the variable pattern of the ciliary waves in *Dileptus* may correspond to the similar observations in *Paramecium* (Mili-  
c e r 1935).

In conclusion it must be stated that the general picture of function of the ciliary apparatus in ciliates becomes more and more complicated: it is different in various ciliates and we have to do with the local differentiation of function within a single cell.

Taking in account the observations reported here, the following conclusions can be made:

1. In *Dileptus* the clearly marked ciliary waves are observed on the proboscis which seems to be the main area for the wave origination.
2. The cilia situated around the cytostomal ring as also the cilia in the caudal region differ in some aspects of the movement when compared with the cilia from other parts of the body.
3. According to the present observations the main direction of the wave propagation during the forward motion of the ciliate was the backward one, while during the reversion the forward one.

### S u m m a r y

The ciliary movement was observed in *Dileptus anser* O. F. M. in the individuals resting upon the slide as well as in those moving forward or backward. The following zones of the ciliary activity could be distinguished: the cytostomal sector of proboscis, the area surrounding the cytostome and the cilia of the body surface and caudal region. The most distinct ciliary waves appear upon the proboscis which seems to be the main place for the wave origination. The metachronal movement upon the rest of the body may have the form of more or less integrated ciliary waves. Usually during the forward motion of the ciliate the waves propagating backward were observed while during the backward movement the reverse was the case. The cytostomal sector of the proboscis is compared with the peristomal region of *Paramecium*.

### STRESZCZENIE

Wykonano obserwacje ruchu rzęskowego *Dileptus anser* O. F. M. u osobników znajdujących się w stanie spoczynku oraz w ruchu naprzód i wstecz. Zostały wyróżnione następujące strefy ruchu rzęskowego: sektor cytostomalny proboscis, okolice cytostomu, strefa ogonowa i reszta powierzchni ciała. Najwyraźniejsze fale rzęskowe występują na proboscis, które może być uważane za główne miejsce powstawania fal. Metachroniczny ruch na reszcie powierzchni ciała może mieć postać mniej lub więcej scalonych fal rzęskowych. Podczas ruchu wymoczka na-

przód obserwowano często fale rozchodzące się ku tyłowi, a w czasie ruchu wstecz — ku przodowi. Przeprowadzono porównanie sektora cytostomalnego na proboscis z rejonem peristomalnym u *Paramecium*.

## REFERENCES

- Doroszewski M. 1962: The reactions of the ciliate *Dileptus* and its fragments to the water shake. *Acta Biol. Exp.* 23, 3—10.
- Dragesco J. 1962: Capture et ingestion des proies chez les infusoires ciliés. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 92, 123—167.
- Dumont J. N. 1961: Observations on the fine structure of the ciliate *Dileptus anser*. *J. Protozool.* 8, 392—402.
- Dryl S. 1959: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. *J. Protozool.* 6 (suppl), Abstr. 96.
- Jones E. E. 1951: Encystment, excystment and the nuclear cycle in the ciliate *Dileptus*. *J. El. Mitch. Sci. Soc.* 67, 205—217.
- Jones E. E. and Beers C. D. 1953: Some observations on structure and behaviour of the ciliate *Dileptus monilatus*. *J. El. Mitch. Sci. Soc.* 69, 42—48.
- Milicer W. 1935: Badania doświadczalne nad systemem neuromotorycznym *Paramecium caudatum*. *Acta Biol. Exp.* 9, 174—193.
- Okajima A. 1954: Studies on the metachronal wave in *Opalina*. III. The regulating mechanism of ciliary metachronism and of ciliary reversal. *Annot. Zool. Jap.* 27, 40—45.
- Párducz B. 1954: Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten II. Neuere Beiträge zum Bewegungs- und Koordinationsmechanismus. *Acta Biol. Ac. Sci. Hung.* 5, 169—212.
- Peschkowski L. 1927: Zur Morphologie von *Dileptus gigas* und *Loxophyllum meleargis*. *Arch. Protistenk.* 73, 179—202.
- Seravin L. N. 1962: Fiziologičeskie gradienty infuzorii *Spirostomum ambigum*. *Citologija* 4, 545—554.
- Seravin L. N. 1962: Mechanizm reversii bienija resnic u infuzorii *Spirostomum ambiguum*. *Citologija* 4, 652—660.
- Sleigh M. A. 1957: Further observations on co-ordination and the determination of frequency in the peristomal cilia of *Stentor*. *J. Exp. Biol.* 39, 106—115.
- Vissher J. P. 1923: Feeding reactions in the ciliate *Dileptus gigas* with the special reference to function of the trichocysts. *Biol. Bull.* 45, 133—140.
- Vissher J. P. 1927: A neuromotor apparatus in the ciliate *Dileptus gigas*. *J. Morphol.* 44, 373—381.

## EXPLANATION OF THE PLATE I

- 1: The cytostomal region in *Dileptus* (Párducz method, ca 800×).
- 2: Ciliary rows in *Dileptus* (ca 1600×).
- 3: Ciliary waves on proboscis (Párducz method, ca 1600×).
- 4: Photomicrograph of the waves taken of a living specimen (ca 480×).
- 5: Two successive photomicrographs taken by movie camera (ca 320×).
- 6: The cilia of the body surface in a living specimen (ca 480×).



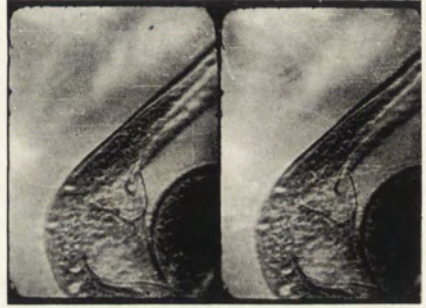
1



4



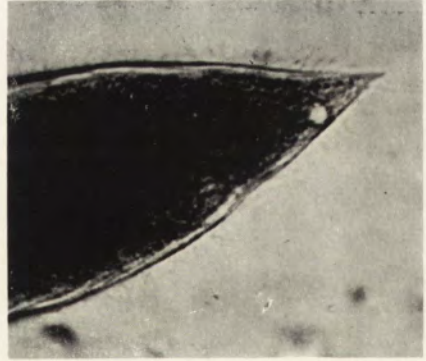
2



5



3



6

M. Doroszewski

auctor phot.



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

Stanisław DRYL

## Oblique orientation of *Paramecium caudatum* in electric field

Orientacja skośna *Paramecium caudatum* w polu elektrycznym

It is well known that *Paramecium caudatum* like many other ciliates swims towards cathode when exposed to d.c. of appropriate voltage (Pl. I 1). Clear evidence was brought by many authors (Verworn 1895, Ludloff 1895, Jennings 1906, Kamada 1929, Kinoshita 1936) that polar action of d.c. is manifested by ciliary reversal on the cathodal side and by activation of normal beat of cilia on the anodal side of the body. The new experimental data on the intracellular potential in *Opalina* (Kinoshita 1954, Okajima 1954, Naitoh 1958, Ueda 1961) and *P. caudatum* (Yamaguchi 1960) suggest that the ciliary reversal is accompanied by depolarization of the cell surface and may be regarded as an analogous state to the excitation in nerve and muscle cells. According to the new "electrotonic" theory of galvanotaxis (Jahn 1961) the highly conducting cytoplasm of ciliate may be regarded as a core conductor immersed in the volume conductor (external electrolyte medium), both separated by the cell membrane of high electrical resistance. It is assumed that in uniform electrical field *Paramecia* will show the signs of depolarization of the cell surface on the cathodal and hyperpolarization on the anodal side of body respectively. It should be emphasized that the "electronic" theory of galvanotaxis offers a reasonable explanation for Ludloff's phenomenon and is in full agreement with variety of other experimental facts concerned with the galvanotactic response in ciliates. Nevertheless some early observations of Jennings 1906 on the oblique and transversal orientation of *Paramecium* in electric field are in strong contradiction to the generally accepted principles of galvanotaxis in *Protozoa*. Jennings suggested that the oblique and transversal orientation of animals to electric lines is due to simultaneous action of thigmotactic and galvanotactic stimuli, however Grębecki 1961 and 1963a noticed that the oblique galvanotactic response may be also observed in actively swimming animals. It was proved by the author (Dryl 1961a) that when *P. caudatum* is placed in citrate-phosphate buffer solution containing the appropriate concentration of  $Ba^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions, the oblique galvanotactic response could be induced and in this case as a rule only one predominant oblique orientation to electric lines was observed. In further studies it was stated that IOGR (Induced oblique galvanotactic response) is not specific for  $Ba^{2+}$  ions or for any other chemical

agents present in medium, since the same response was also observed in medium containing sodium (Dryl 1962) or potassium salts (Grębecki 1963b).

Recently the author was able to find the necessary conditions for induction of two complementary IOGR-s at selected voltage of d.c. and suitable chemical composition of external medium. The purpose of the present study is to elucidate some aspects of IOGR in *Paramecium* on the basis of new experimental data.

#### Material and methods

The experiments were carried out on *P. caudatum* strain isolated 1955 in Warszawa and subsequently grown in mass culture on the standard lettuce infusion inoculated with *Aerobacter aerogenes* (Sonneborn 1950). The galvanotactic response in *Paramecium* was induced by d.c. of different voltage using the platine-wire parallel electrodes which were placed at distance ca 7.5 cm one from another in thin layer of fluid (0.2—1.0 mm) spread uniformly on the surface of glass plate. The full area of observation was approximately  $7.5 \times 2.5$  cm. The locomotion of animals was recorded by means of glass plate photomacrographic technique which was described in detail elsewhere (Dryl 1958, 1961b). All experiments were carried out at room temperature  $20^{\circ}$ — $22^{\circ}$ .

#### Observations

Before starting experiments *Paramecia* were thoroughly washed 1—2 hours in pure citrate-phosphate buffer solution of pH 7.0 (Dryl 1961b) and then were placed for 4—5 minutes in the same buffer soln. with addition of 1.5 mM  $\text{BaCl}_2$ . As it was reported previously (Dryl 1961c) in this medium *Paramecia* swim backwards during the first 30—50 sec. of exposure while afterwards they show a very characteristic motor response which resembles Jennings avoiding reactions following one after another at intervals of 0.5—1 sec. by average (Pl. I 2). In this physiological state the animals usually sink to bottom and swim close to the substrate. As it was shown by the author elsewhere (Dryl 1961a) under these conditions the galvanotactic response of *Paramecium* appears in four successive phases depending on the applied voltage of d.c. At threshold voltage the animals orientate themselves parallelly to electric lines and show the homodrome orientation (the phase 1). Afterwards the animals exposed to the same voltage swim backwards to anode along the lines of electric field (the phase 2). At higher voltage *Paramecia* are swimming obliquely and backwards to anode or obliquely and forwards to cathode, in both cases showing the orientation SE — NW when looking at preparation downwards with cathode on the left (the phase 3). At still higher voltage the animals are swimming forwards and directly towards cathode (the phase 4).

In this connection it should be noticed that recently (Grębecki 1963b) similar effects of d.c. on the ciliary activity in *P. caudatum* were noticed after short lasting exposure to medium containing potassium salts.

In conditions under report the backward swimming towards anode (the phase 1 and 2) was induced at d.c. density ca  $2000 \mu/\text{cm}^2$  while IOGR appeared at the density  $5000$ — $7000 \mu/\text{cm}^2$ .



## IOGR in single glass-plate experiments

The first observations were carried out on *Paramecia* placed in a thin layer of experimental medium which was spread on the substrate without cover glass. As it was expected the only IOGR orientation observed was SE — NW (Pl. II 3). As a general rule the animals showing IOGR were swimming close to the substrate and many of them were even touching the substrate while moving. Some significant difference in behaviour was noticed between the obliquely orientated *Paramecia* swimming forwards and backwards. According to microscopic observations the animals swimming backwards are more strongly attracted to the substrate than those moving forwards. It was stated many times that *Paramecia* swimming forwards may show IOGR even when moving at a distance 100—200  $\mu$  from substrate. These observations suggest that the surface phenomena at the interface glass-water must be of importance for manifestation of IOGR with a definite orientation to lines of electric field.

## IOGR in double glass-plates experiments

Additional series of experiments was run with *Paramecia* kept in 1 mm, 0.5 mm and ca 0.2 mm deep layer of experimental medium placed between two glass-plates which were arranged horizontally or vertically. In these conditions the animals were exposed to d.c. of suitable voltage for evoking IOGR (6500  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). In this experiment IOGR appeared in two directions: SE — NW and NE — SW as it is shown on Pl. II 4. The microscopic observations revealed that the animals swimming close to the bottom glass-plate show IOGR orientation SE — NW while those swimming close to the upper glass-plate — NE — SW respectively. It should be noticed that sometimes even in experiments with single glass-plate *Paramecia* may show two IOGR orientations; in such cases the orientation SE — NW appeared in animals swimming close to the bottom glass-plate while the second orientation NE — SW was found in animals swimming along the interface air-water.

## IOGR in medium with suspended solid particles

In another series of experiments IOGR was observed under high power microscope in *Paramecia* kept in suitable medium with suspended solid particles (yeast cells). In this medium the ciliary response due to IOGR could

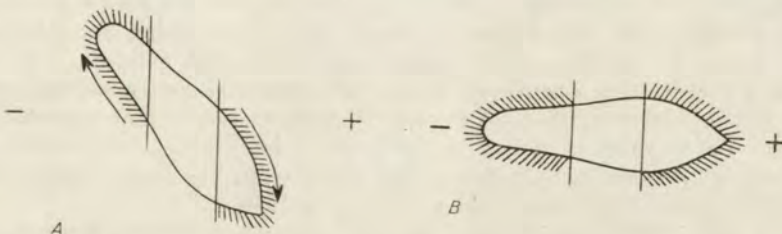


Fig. 1. The Ludloff phenomenon. The ciliary reversal on cathodal side of *Paramecium*. A. Oblique position to electric field. B. Homodrome position, parallel to electric lines

be observed directly; some experiments were recorded on 16 mm motion picture film. It was a great surprise to state that ciliary response during IOGR is characteristic for Ludloff's phenomenon (Fig. 1) i. e. the ciliary reversal appeared in larger area on the cathodal side of body while the normal beat of cilia was activated on the anodal side of body.

When the animal is exposed to d. c. voltage of threshold value, it swims backwards to anode and the beat of cilia in normal direction at posterior end of body causes formation of two whirlpools which were recorded on motion picture film (Pl. III 5) as two symmetrical dark spots, round or oval in shape. These whirlpools are visible on film thanks to the movement of suspended yeast cells in the medium. It was interesting to state that as soon as IOGR appeared the whirlpool on the anodal side of posterior end of animal was much better expressed than the analogous whirlpool on the opposite (cathodal) side of the body (Pl. III 6, 7). In animals showing IOGR and swimming forwards the whirlpools appeared at the anterior end of *Paramecium*.

According to known principles of mechanics of ciliary movement the obliquely orientated *Paramecia* should change the swimming direction until the normal (homodrome) orientation towards cathode was established because dal) side of the body (Pl. III 6,7). In animals showing IOGR and swimming on both sides of the long axis of body. Yet in spite of that, *Paramecium* showing IOGR swims against ciliary force resulting from d.c. effects on the organism.

It is suggested by the author that IOGR appears as a result of two forces acting on *Paramecium* simultaneously. The first one is the ciliary force which tends to orientate the animal homodromally parallel to lines of electric field. As it was mentioned before, this force is related to the polar effects of d.c. on *Paramecium* cell. The existence of the second force is still hypothetical but we may suppose that this second force acts at right angle ( $90^\circ$ ) to the first one and causes the animal to orientate the long axis of the body along S — N line with the anterior end of body directed towards N if cathode is on the left and experimental medium with *Paramecia* is spread over the bottom glass plate.

#### Discussion

Till now we possess no adequate theory which could explain in satisfactory manner the mechanism of IOGR in *Paramecium*. Jennings suggested that in *Paramecium* the oblique or transversal orientation in electric field depends on the interaction between thigmotactic and galvanotactic stimuli and that a more intense action of peristomal cilia may be an important factor in this respect. In contradiction to this hypothesis is the fact that IOGR was also observed in animals swimming at appreciable distance (100—200  $\mu$ ) from the substrate and that IOGR occurs only at a definite voltage which is usually 100—200% higher than threshold value for galvanotaxis.

Grębecki 1961 tried to explain the oblique galvanotactic response in *Paramecium* by morphological or physiological asymmetry of animal but no details were given as to the postulated mechanism of response. This hypothesis is also doubtful since according to generally accepted view in normal conditions *Paramecium* thanks to spiraling movement behaves like functio-

nally symmetrical unit and this is also true in case of the normal cathodal galvanotaxis.

In his first report on IOGR in *P. caudatum*, Dryl 1961a suggested that the oblique galvanotactic response may be induced by simultaneous action of d.c. and stationary magnetic field around platine-wire point-electrodes. However this hypothesis proved to be not valid since the further experimental studies revealed that IOGR may also appear in absence of stationary magnetic fields.

The present observations suggest that IOGR in *Paramecium* is in some way connected with the surface properties of substrate and that at suitable voltage the animals are attracted by the substrate and show IOGR while swimming close to its surface. On the other hand it is well known that when d.c. is applied to electrolyte solution the surface of substrate (glass-plate) is charged negatively. In conditions under report the interface potential (glass-plate — water) was between  $-15$  mV to  $-85$  mV.

If we assume that *Paramecium* exposed to d.c. may be charged on both ends of the body (Dryl 1962) the animal may behave not only like core conductor immersed in the volume conductor (Jahn 1961) but also like condenser of variable capacity which is continuously charged and discharged on the anodal and cathodal side of the body and this process may last so long as d.c. is applied. It may be postulated that at close distance from substrate *Paramecium* may be affected not only by electrostatic but also by electromagnetic forces and in consequence the long axis of animal would be orientated obliquely or transversally to the lines of electric field. Some support for this hypothesis may be found in observations which indicate that a.c. of low frequency (Statkewitsch 1904, Scheminzky 1926, Hausmann 1927) and electromagnetic fields of high frequency (Teixeira-Pinto, Nejel-ski, Cutler and Heller 1960) induce in *Paramecium* and other *Protozoa* the transversal orientation towards lines of electric field. As yet no satisfactory explanation was given for these phenomena, but it is hoped that further studies on effects of electrostatic and electromagnetic fields galvanotactic response in *Protozoa* will give the valuable information about the process of orientation of organism in the electric field with special attention paid to physiological properties of the cell membrane and cilia.

### Summary

In *P. caudatum* the induced oblique galvanotactic response (IOGR) is connected with the negatively charged surface of substrate (glass plate). Two IOGR orientations were observed when *Paramecia* were placed in a thin layer of medium (citrate-phosphate buffer soln. of pH 7.0 with addition of 1.5 mM BaCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>) between two glass plates and were exposed to d.c. of selected voltage. The animals swimming close to the bottom glass-plate showed IOGR orientation SE — NW while those swimming close to the upper glass plate showed orientation NE — SW when looking at the preparation downwards with cathode on the left.

The possible mechanism of IOGR was discussed with reference to the new experimental data.

## STRESZCZENIE

Indukowana skośna galwanotaksja *Paramecium caudatum* wykazuje związek z ujemnym potencjałem powierzchni podłoża (płytki szklanej). *Paramecia* umieszczone w cienkiej warstwie płynu (roztwór buforowy cytrynianowo-fosforanowy o pH 7.0 z dodatkiem 1.5 mM BaCl<sub>2</sub> i CaCl<sub>2</sub>) między dwiema płytkami szklanymi wykazywały dwa kierunki galwanotaksji skośnej pod wpływem prądu stałego o odpowiednim natężeniu. Pierwotniaki poruszające się w pobliżu dolnej płytki szklanej wykazywały orientację skośną o kierunku SE — NW, podczas gdy pierwotniaki poruszające się w pobliżu płytki górnej wykazywały orientację NE — SW przy obserwacji z góry oraz przy umieszczeniu katody z lewej strony.

W związku z nowymi danymi doświadczalnymi omówiono mechanizmy, związane z pojawianiem się orientacji skośnej w polu elektrycznym.

## REFERENCES

- Dryl S. 1958: Photographic registration of movement of *Protozoa*. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 6, 429—431.
- Dryl S. 1961a: On the mechanism of induced oblique galvanotactic response in *Paramecium caudatum*. Transactions of the 1-st Int. Conf. Prague 1961 (in press).
- Dryl S. 1961b: The velocity of forward movement of *Paramecium caudatum* in relation to pH of medium. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Dryl S. 1961c: The ciliary reversal in *Paramecium caudatum* induced by simultaneous action of Barium and Calcium ions. J. Protozool. 8 (suppl.), Abstr. 55.
- Dryl S. 1962: Further studies on the induced oblique galvanotactic response in *Paramecium caudatum*. J. Protozool. 9 (suppl.), Abstr. 85.
- Grębecki A. 1961: Electrobiological concept of galvanotaxis in *Paramecium caudatum*. Transactions of the 1-st Int. Conf. Protozool. Prague 1961 (in press).
- Grębecki A. 1963a: Galvanotaxie transversale et oblique chez les Ciliés. Acta Protozool. 1, 91—98.
- Grębecki A. 1963b: Rebroussement ciliaire et galvanotaxie chez *Paramecium caudatum*. Acta Protozool. 1, 99—112.
- Hausmann G. 1927: Über die Bewegungen einiger ciliaten Protozoen im Wechselstrom. Biol. Generalis 3, 463—474.
- 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. 1929: Control of galvanotropism in *Paramecium*. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo 2, 123—139.
- Kinosita H. 1936: Electric stimulation in *Paramecium*. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo 4, 187—194.
- 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 Arch. Ges. Physiol. 59, 525—554.
- Naitoh Y. 1958: Direct current stimulation of *Opalina* with intracellular micro-electrode. Annot. Zool. Jap. 31, 59—73.
- Okajima A. 1954: Studies on the metachronal wave in *Opalina*. III. Time change of effectiveness of chemical and electrical stimuli during adaptation in various media. Annot. Zool. Jap. 27, 46—51.
- Scheminzyk Ferd. und Scheminzyk Fried. 1926: Über WechselstromEinstellung bei einigen Ciliaten (Oszillotaxis). Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 213, 112—118.

- Sonneborn T. M. 1950: Methods in general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool. 113, 87—147.
- Statkewitsch P. 1904: Galvanotropismus and Galvanotaxis der Ciliata. Zschr. Allg. Physiol. 4, 296—332.
- Teixeira-Pinto A. A., Nejelski Jr. L. L., Cutler J. L. and Heller J. H. 1960: The behavior of unicellular organisms in an electromagnetic field. Exp. Cell Res. 20, 548—564.
- Ueda K. 1961: Electrical properties of *Opalina*. I. Factors affecting the membrane potential. Annot. Zool. Jap. 34, 99—110.
- Verworn M. 1895: Allgemeine Physiologie. Jena.
- 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.

## EXPLANATION OF PLATES I—III

1: Normal, cathodal galvanotaxis (*P. caudatum*).

2: So-called periodic reversal (Dryl 1961c) shown by *P. caudatum* placed in citrate-phosphate buffer soln. with addition of 1.5 mM BaCl<sub>2</sub> and 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>

3: Induced oblique galvanotactic response (IOGR) in *P. caudatum*. The animals are moving backwards along the line NW — SE (single glass plate experiment).

4: Induced oblique galvanotactic response (IOGR) in *P. caudatum*. The animals are moving backwards along the lines NW — SE and SW — NE (double glass plate experiment).

5: The beginning of IOGR. Experiments with suspended solid particles in medium. The animals are moving backwards along the line NW — SE. Two symmetrical whirlpools are visible on both sides of posterior end of *P. caudatum*.

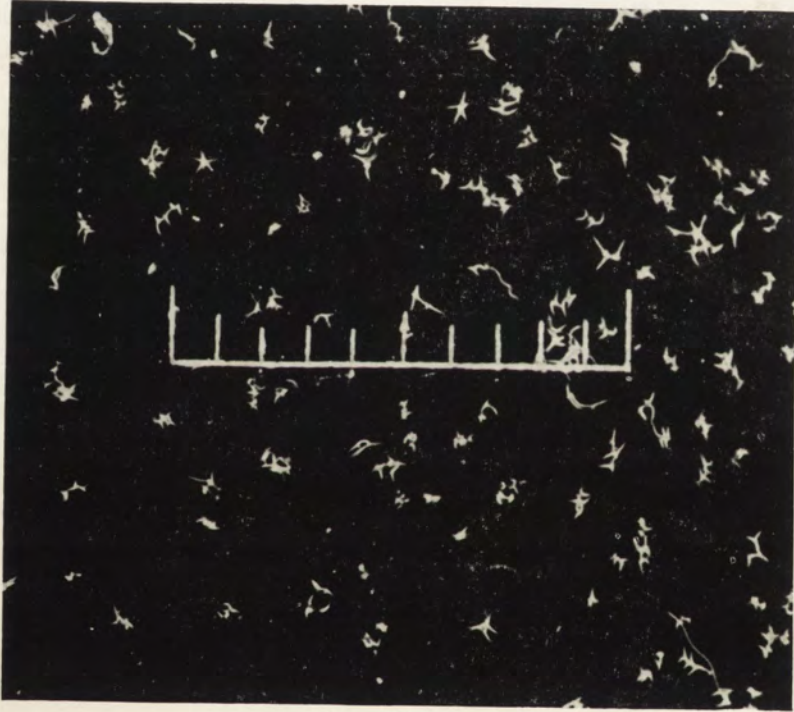
6—7: Induced oblique galvanotactic response (IOGR) in *P. caudatum*. Single whirlpools are visible at anodal sides of posterior ends of *Paramecia*.

[The paths covered by animals and the direction of movement were recorded by means of glass-plate photomacrographic technique (Dryl 1958, 1961b). Exposure — 5 sec., scale — 1 cm].





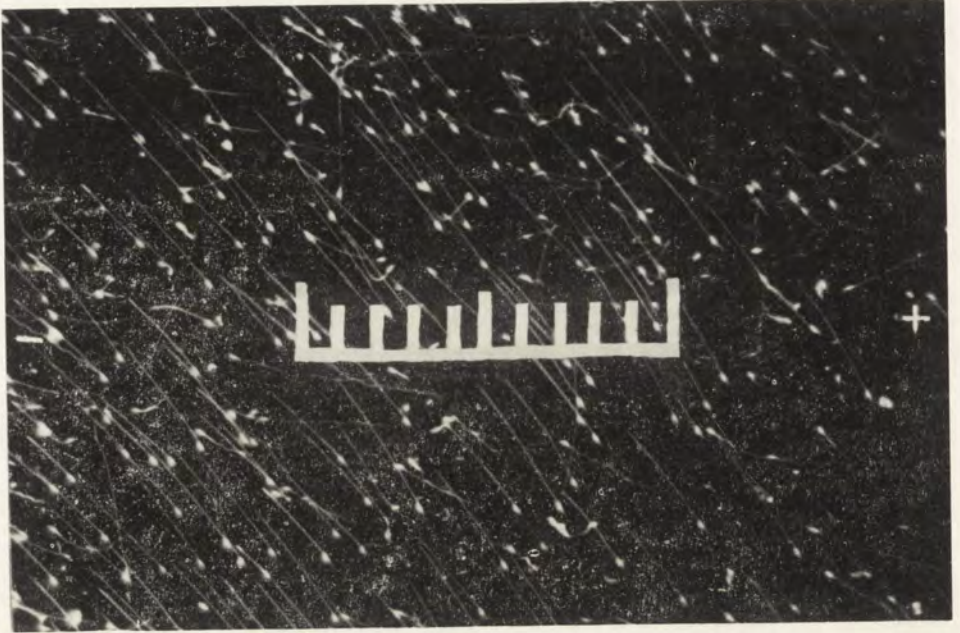
1



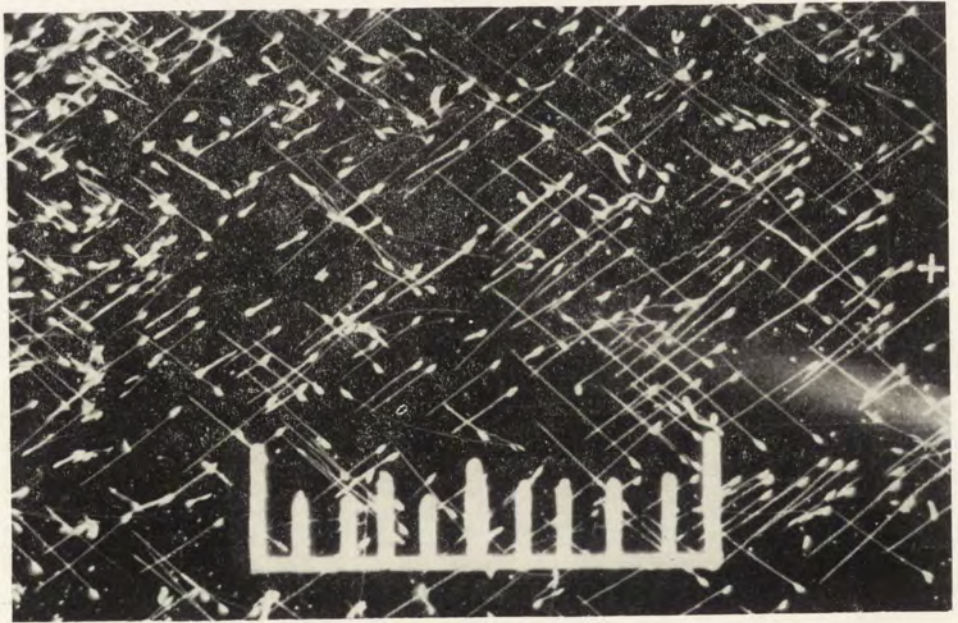
2

S. Dryl

auctor phot.



3

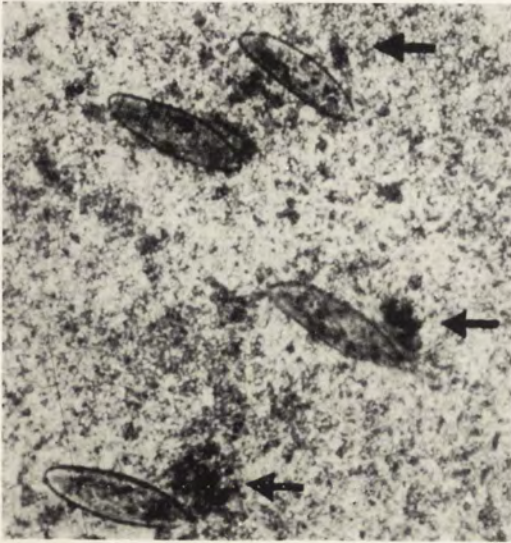


4

S. Dryl

auctor phot.

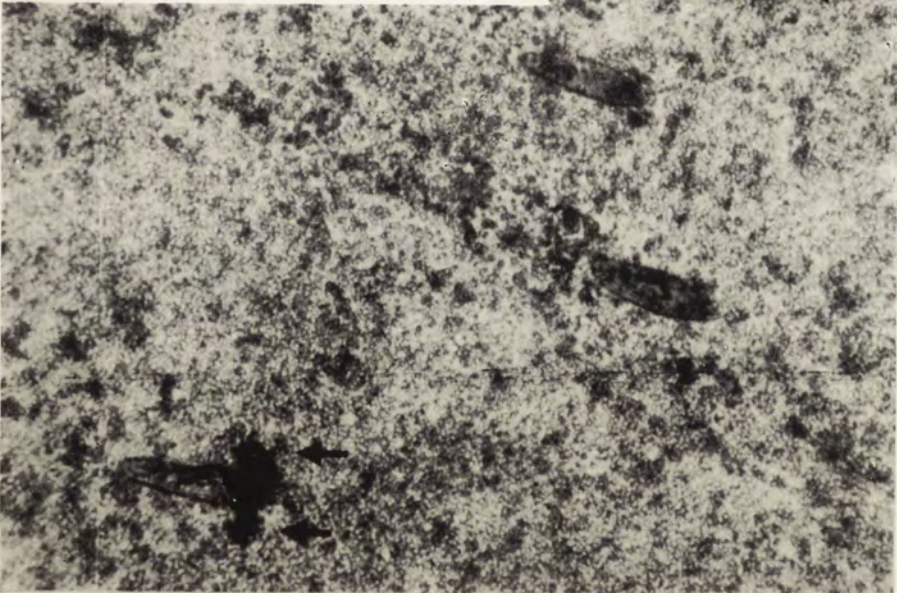
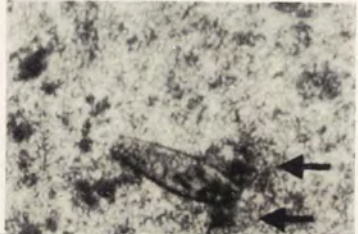




6



7



5

S. Dryl

auctor phot.



Abteilung für Allgemeine Biologie des M. Nencki Institutes für Experimentelle Biologie,  
Polnische Akademie der Wissenschaften, Warszawa 22, Pasteura 3

Włodzimierz KINASTOWSKI

## Der Einfluss der mechanischen Reize auf die Kontraktilität von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Wpływ bodźców mechanicznych na kurczliwość  
*Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

In den letzten Dezenien finden wir einige Publikationen, welche sich mit der Physiologie und dem Mechanismus der Kontraktilität bei *Spirostomum ambiguum* eingehender befassen. Manche von ihnen kann man, in allgemeinen, auf morphologische und physiologische einteilen, obwohl diese Einteilung darf man nicht zu streng betrachten, weil — von einer Seite treffen wir hier auch Arbeiten, welche diese beide Untersuchungsrichtungen zusammenfassen, von anderer — dieselbe Problematik stützt sich oft auch auf anderen Untersuchungsobjekten und wurde mit verschiedenen Methoden ausgeführt. Zu den morphologischen Arbeiten gehören hier vor allem die Untersuchungen über die kontraktile Elemente (Alverdes 1922, Müller 1926, Czerniewski 1930, 1935, Browne 1938 u.a.), welche, im Grunde übereinstimmend, das Auftreten der Kontraktilität mit der subpellikularen, kontraktilen Elementen der Zelle verbinden. Diese Untersuchungen knüpfen eng mit den Arbeiten dieser Forschern an, welche sich mit der Lokalisation der materiellen Unterlage der Bewegungsreaktionen bei den Protisten beschäftigten. Es gehören hier vor allem die Untersuchungen von Hilton 1928 und Gelei 1929 über „das Nervensystem“ bei Protisten, von Klein 1932, welcher eine Analogie zum gewöhnlichen Reflex in der Übertragung der Reize von dem Endorganoid der Wimpern in dem Basalkörper auf die motorische Komponente vermutet, dann von Yocom 1918, Rees 1922 und Mac Dougall 1928, über die Neuromotorien, und viele andere, welche der Feststellung einer Analogie zwischen den Reizübertragungssystem bei den Protisten und dem Nervensystem der Metazoa mehr oder weniger sich nähern (Bozler 1926, 1927, Milicer 1935, Raabe 1954 u.a.).

Die physiologische Richtung der Untersuchungen vertreten vor allem die Arbeiten von Jennings 1899, welcher das Aufhören der Kontraktionen unter dem Einfluss von einfachen mechanischen Reizen bei *Spirostomum ambiguum*, *Stentor roeseli*, *Epistylis* und *Carchesium* beobachtete. Weitere Untersuchungen von Neresheimer 1903, Pütter 1904, 1914 und Blättner 1926 haben zu der Feststellung des Aufhörens der Kontraktionen bei *Spirostomum ambiguum* unter dem Einfluss rhythmisch sich wiederholenden mechanischen Reize geführt und die ganze Frage auf das Niveau des Lernens und des Gedächtnisses übertragen (besonders Wawrzyńczyk 1937). Solche Stellungnahme schienen die Untersuchungen an anderen Protisten zu bestätigen, besonders die Arbeiten von Kolzoff 1911 über die Kontraktilität des Stielchens von *Zoothamnium*, dann von Danisch 1921, Galiano 1923, Fortner 1926, Plavilstchikov 1928, Pastori 1932 und

Skróchowska 1938 über den Mechanismus der Kontraktilität und das Aufhören der Kontraktionen bei *Vorticella nebulifera*, so wie auch viele andere, welche aufweisen, dass die untersuchten Protisten hören mit ihren Reaktionen auf die sich wiederholende mechanische Reize allmählich auf, weil sie sich an die einwirkende Reize gewöhnen.

In dieser Arbeit wollen wir — die Frage des Lernens an der Seite lassend — vor allem eine eingehende Analyse der Regelmässigkeiten in dem allmählichen Aufhören der Kontraktionen unter dem Einfluss der dauernd periodisch einwirkenden mechanischen Reize durchgeföhren. Es wundert uns dazu eine gewisse Einseitigkeit der vorgeführten Arbeiten auf, welche — aus der Regel — den physiologischen Zustand der untersuchten Tiere nicht beachtet hatten, dann auf quantitativ kleinen Material durchgeföhrt, keine statistische Bestätigung der Ergebnisse berücksichtigt hatten und sich, im Grunde, nur mit dem Durchforschen von einem aus den Parametern des einwirkenden Reizes befriedigt haben, z.B. der Frequenz des Reizes (Skróchowska 1938, Wawrzynczyk 1937).

Herrn Prof. Dr. Jan Dembowski bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und Seinen wertvollen Rat bei der Ausführung derselben zu grossem Dank verpflichtet.

#### Das Objekt und die Methode

Als Untersuchungsobjekt wurde *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. (var. *major*) ausgewählt. Die Protisten waren in einem Kulturmedium nach Specht 1935 (modifiziert durch die Zugabe von anderen Gattungen des Grasses und einigen Reiskörner) oder auf den schwachen Dekokten von getrockneten Kopfsalatblätter mit einigen Haferkörner gezüchtet. Das Medium war jede 8—10 Tage erfrischt und das pH wurde in den Grenzen von 7 bis 8 gehalten. In solchen Verhältnissen züchteten sich die Protisten gut, bei gleichmässiger Raumverbreitung und wiesen gute physiologische Kondition auf, welche vor allem dadurch zum Ausdruck kam, dass sie sofort kontraktionsfähig auf verschiedene, sogar ganz schwache, Reize waren.

Die methodische Handlung führte immer zur Herausrufung der Erschütterungen des Mediums mit den untersuchten Protisten und zu der Beobachtung ihres Verhaltens. In allen Experimenten wurde die unter a. beschriebene Methodik angewandt. Nur bei der Wiederholung einigen Versuchen nach Wawrzynczyk 1937, wurde seine, unter b. angegebene Methodik benutzt.

a. Als Reiz, welcher die Erschütterungen des Milieus herausruft, wurde der frei abfallende Tropfen des Milieus angewandt. Die Protozoen befanden sich in einem Glasgefässchen von ca 2 Cm<sup>3</sup>. mit dem eingerichteten Durchfliessen der überschüssigen Flüssigkeit. Über diesem Gefässchen befand sich ein grösseres Gefäss mit Kulturflüssigkeit, von welcher waren die Protisten für die Experimente herausgenommen. Dieses Gefäss hatte einen regulierbaren Ausfluss was die Erreichung von verschiedener Frequenz des abfallenden Tropfens gestattete. Verschiedene Höhe, von welcher die Tropfen des Kulturmediums herabfielen regulierte die Kraft des angewandten Reizes. Die Kraft des Reizes wurde, ähnlich wie in den Versuchen von Danisch 1921, als Energie betrachtet und in erg gemessen. In solchen Verhältnissen blieb das Volumen des Mediums immer konstant, obwohl das Medium selbstständig wechselte und erfrischt wurde. Die sich frei in verhältnismässig grossen Flüssigkeitsvolumen

bewegenden Protisten waren durch etwas schief gestellten Binokular beobachtet. Die Reize, ebenso wie die Reaktionen der Tiere wurden gezählt und später statistisch bewertet.

b. Die andere Weise der Herausrufung der Erschütterungen war nach W a w r z y ń c z y k 1937 eingerichtet. Die einzelnen Individuen wurden in ein paar Tropfen des Mediums auf dem Lintnergläschen untersucht. Über die Einsenkung des Gläschens wurde eine Feuchtigkeitskammer aufgebaut. Das Lintnergläschen war auf dem Tischchen einer Lupe befestigt. Die Erschütterungen des Glases kamen so zum Stande, dass die Zähne eines Rades, welches mit einem Klinostat zusammengekoppelt war, haben bei dem Drehen ein Ende des Hebers (Hämmerchen) berührt und so in die Höhe geholt. Das Hämmerchen fällt dann auf eine keilförmige Bolze, welche die Erschütterung auf das Glas überträgt. Von anderer Seite des Objektgläschens befand sich eine elastische Einlage, welche das Gläschen nach der Erschütterung in die zuvorige Lage zurückschiebt. Die Frequenz der Schläge regulierte man mit dem Schieber des in den Umkreis eingeschalteten Widerstandsapparates, oder durch die Wechselung der Zahl der Zähne. Die Kraft des Reizes betrug ca 20000 erg.

Bei der Bearbeitung der Ergebnisse hat man die vielvektorale Klassifikation des ganzen rohen Experimentmaterials nach der Variationsanalyse von Fischer berücksichtigt, zwei Niveaus der Genauigkeit annehmend:  $P_1 = 0.95$ ;  $P_2 = 0.99$ . Die festgestellte statistische Wesenheit bei  $P_1$  ist durch \*, bei  $P_2$  durch \*\* gekennzeichnet.

#### Die Feststellung der optimalen physiologischen Verhältnisse

*Spirostomum ambiguum* reagiert auf einen mechanischen Reiz (Erschütterung des Wassers, unmittelbares Berühren usw.), so wie auch auf starke chemische und elektrische Reize, mit der vollen Kontraktion (bis  $1/3$  normalen Körperlänge). Nach der Kontraktion findet die Ausstreckung des Körpers, die sofortige Rekontraktion zu der vorigen Körperlänge oder zu dem Krampfzustand statt. Der Krampfzustand charakterisiert sich mit der Verkürzung der Körperlänge bis  $2/3$ , mit grosser Verminderung der Reaktivität des Tieres und kann längere Zeit anhalten. Diesen Zustand kann man immer in den für das Tier ungünstigen Milieuverhältnissen beobachten. Wenn sie nicht ändern, dann kommt es zum Durchbrechen der Pellikula und zum Tode. Weil man solche Krampfzustände niemals in den optimalen Verhältnissen beobachtet, so muss man sie als etwas pathologisches betrachten. Die Protisten weisen in normalen Verhältnissen grosse und sofortige Reaktivität auch auf so schwache Reize, wie z.B. das Berühren der Wasseroberfläche oder die Zückung eines anderen Individuums in der Nähe.

Der frei abfallende Tropfen verursacht die Erschütterungen des Mediums und jedermalige Kontraktion von *Spirostomum*. Dieser Reiz jedoch in den gleichmässigen Zeitpausen angewandt, verursacht schon nicht jedermalige Zückung des Tieres. Die Kontraktionen werden immer seltener und hören endlich vollständig auf. Bevor wir aber eingehender an diese Erscheinung kommen, wollten wir einige optimale Untersuchungsverhältnisse feststellen zu

versuchen. Unter Acht waren vor allem pH und die Temperatur des Milieus genommen. Die Tiere waren auch mit den Tropfen des Mediums und nicht des reines Wasser gereizt, um möglichst genau ihre Lebensverhältnisse beibehalten.

Tabelle 1

Das Überleben von *Spirostomum ambiguum* in der Lösungen mit dem pH von 4.98 bis 9.40

pH	50% stirbt nach	pH	50% stirbt nach	pH	50% stirbt nach
4.98	10–15 Min.	6.72	~	8.00	24 Stunden
5.74	100–120 Min.	7.14	~	8.36	24 Stunden
5.94	180–300 Min.	7.42	~	8.62	60 Min.
6.30	24 Stunden	7.62	~	8.82	20 Min.
				9.40	5–10 Min.

In den Experimenten mit pH des Milieus hat man das Überleben, das allgemeine Verhalten und Kontraktilität berücksichtigt. Als Kriterium des Überlebens hat man den Tod von 50% der Individuen nach 24 Stunden angenommen (Grębecki and Kuźnicki 1956). Als Milieu wurden Lösungen des zitron—phosphor Puffer (für niedere pH) und boran Puffer (für höhere pH) angewandt. Man hat 15 Cm<sup>3</sup> der Pufferlösung mit 15 Cm<sup>3</sup> Medium mit ca 50 Individuen pro 1 Cm<sup>3</sup> gemischt und das End-pH gemessen.

Die Grenzen der Überlebensmöglichkeiten scheinen also zwischen pH 6.30 und 8.36, mit dem Optimum bei pH 7.40 zu liegen. Mehr toxisch scheinen die basische Lösungen (von pH 8.00 ab) als die saure sein. Von pH 8.00, sogar schon von pH 7.62 beginnen die Protisten auf den Boden herabzusinken (vergl. Jenkin 1927). Bei pH 8.36 beobachtet man immer mehr Individuen in dem Krampfzustand gekrümmt, was endlich zum Tode führt. Von dem Optimum in die saure Richtung gehend, beobachten wir eine gewissermassen umgekehrte Erscheinung. Die Protisten zeigen eine negative Geotaxis, schwimmen unter die Mediumoberfläche und behalten ihre Bewegungsaktivität bei (pH 6.30), dann diese Aktivität vermindert sich merklich und einzelne Individuen verbinden sich in grössere mit Schleim zusammengeklebte Aggregate. Das scheint einig mit den Observationen von Saunders 1924 sein, welcher eine negative Geotaxis in den sauren Lösungen beobachtete. Weitere Aufsäuerung des Milieus führt zum Herabfallen ganzer Klümpchen von Protisten auf den Boden und zum schnellen Tode. Bei den grösseren pH als 8.00 beobachtet man immer öfters die von selbst kommende Kontraktionen, welche nicht selten zum Durchbrechen der Pellikula führen. In den sauren Lösungen stellt man die von selbst hervortretende Zückungen selten fest (pH 6.30) und bei dem Zusammenkleben in grössere Klümpchen (pH 5.94) reagieren die Tiere nur auf das unmittelbare Berühren. Man hat auch die Protisten mit den rhythmisch herabfallenden Tropfen der Lösungen von pH 6.30 und 5.94, dann pH 8.00 und 8.36 gereizt, also mit diesen Lösungen in welchen konnte man deutlich den abnormalen physiologischen Zustand beobachten. In keinem

Falle konnte man die (in den normalen Verhältnissen feststellbare) Gewöhnung an den wirkenden Reiz erreichen. Die Reaktionen waren — im Grunde — unregulär, traten sporadisch und „unerwartet“ auf, auch in dieser Periode, in welcher bei den normalen Tieren schon eine Gewöhnung beobachtet wurde.

Was die Temperatur anbelangt, dann wurden die Untersuchungen in den Temperaturen 4°, 8°, 15°, 19° und 23°C durchgeführt. Bei den Temperaturen von 4° und 8° konnte man eine Verminderung der Bewegungsaktivität und das Herabsinken auf den Boden des Gefäßes feststellen. Den unregulären, gestörten Verlauf der Kontraktilität konnte man nur bei den Grenztemperaturen, eher bei 23° beobachten. Im allgemeinen, in den Zimmertemperaturen, waren die Tiere voll reaktionsfähig.

Alle weitere Untersuchungen wurden dann in Zimmertemperaturen und bei dem pH des Mediums ca 7.00 durchgeführt.

### Der Einfluss der Reizstärke

In den vorgeführten Experimenten wurde die Stärke des Reizes durch die potentielle Energie des frei abfallenden Tropfens des Mediums in erg gemessen und betrug entsprechend: 400, 800, 1600, 3200 und 4800 erg. Die Frequenz des Reizes 10/ Min.

Tabelle 2

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen in %

Die Reizstärke	400	800	1600	3200	4800
Zeit in Min.	erg	erg	erg	erg	erg
1	52	58	80	90	94
2	30	40	64	80	86
3	26	26	52	72	76
4	12	26	38	62	80
5	14	18	38	52	60
6	8	12	28	48	66
7	6	12	18	40	48
8	2	8	14	42	52
9			20	32	40
10			10	32	40
11			8	34	26
12			6	30	34
31			10	32	22
14			4	24	26
15			2	20	18
Σ	150	200	392	690	768

Bei jeder angewandten Reizstärke konnte man feststellen, dass das Aufhören der Kontraktilität, mit der Zahl der Kontraktionen gemessen, hängt von einer Seite von der Stärke des Reizes, von anderer von der Zeit ihrer Ein-

wirkens. Die mittlere Zahl der Kontraktionen durchschnittlich für alle Minuten des Experimentes geprüft, hängt von der Stärke des angewandten Reizes ab. Je stärker ist der Reiz, desto grössere auch die Zahl der Kontraktionen. Auch die Zahl der in jeder Minute des Experimentes ausgeführten Kontraktionen ist um so höher, wie grösser ist die Stärke des angewandten Reizes. Gleichzeitig mit der Vergrösserung der Reizstärke vermindert sich die Planmässigkeit im Verlaufe des Aufhörens der Kontraktibilität. Während bei der Reizstärke 400 erg haben die untersuchten Protisten in der ersten Minute nur 52% der maximal möglichen Zahl der Kontraktionen ausgeführt, dann bei der Reizstärke 1600 erg die Zahl der Kontraktionen erhöht sich bis 80%, und bei der Reizstärke 4800 erg bis 94%, also — praktisch genommen — schon 100% der maximal möglichen erreichte. Während die Protisten bei der Reizstärke 400 erg schon in der ersten Minute des Experimentes nicht auf jeden Reiz kontrahieren, dann bei der Reizstärke 4800 erg reagieren sie praktisch jedesmal.

Bei den angewandten Reizstärken kam es zum völligen Aufhören der Kontraktionen durchschnittlich nach 10—30 Min. Weitere Reizung ruft schon im Grunde keine Kontraktionen hervor. Sporadische Zückungen treffen sich sehr selten und wurden hauptsächlich durch Nebenfaktoren verursacht. Als das Kriterium des völligen Aufhörens der Kontraktionen wurde ca 10 minutige Reizung nach der letzten Kontraktion angenommen, während welcher keine Kontraktion vorkommt.

Während bei der Reizstärke 400 und 800 erg findet das völlige Aufhören der Kontraktionen nach ca 10 Min. statt, dann bei 1600 erg kommt es dazu nach 15—20 Min. der Reizung. In allen Fällen kommt es zum völligen und langdauernden Aufhören der Kontraktionen auf den rhythmisch wirkenden Reiz. Jedoch mit der Vergrösserung der Reizstärke verlängert sich sehr bedeutend die Reaktionszeit der Protisten.

Unabhängig von der Reizstärke beobachten wir gewisse Abhängigkeit des Herabsinkens der Kontraktibilität von der Wirkungszeit des Reizes. Es bestätigt das folgende, nur für die drei grössere Reizstärke zusammengestellte Tabelle.

Das Ergebnis der Untersuchung der Differenzen in der Zahlen der Kontraktionen in den aufeinander folgenden Minuten des Experimentes, geprüft durchschnittlich für alle Reizstärke, weist ein deutliches Herabsinken in den ersten Minuten auf. In den weiteren Minuten weist dieses Herabsinken schon nicht so einen gewaltsamen Charakter auf. Die Zahl der Kontraktionen nimmt also u n a b h ä n g i g von der Reizstärke mit der Zeit ab.

In allen weiteren Experimenten wurde die Reizstärke 1600 erg angewandt.

Um die Reaktionen von *Spirostomum ambiguum* auf sehr starke Reize zu prüfen, hat man einige Experimente mit der von W a r z y ń c z y k 1937 angegebener und früher unter b. beschriebener Methode durchgeführt.

Die Reizstärke betrug hier ca 20 000 erg und die Frequenz entsprechend 6,12 und 18 pro Min. aber hier wurde nur die Reizfrequenz 12/Min. angewandt und analysiert (vergl. die Tabelle 9).

Weil bei so starken Reiz die Zeit des Experimentes verlängerte sich sehr und konnte durchschnittlich um ca 180 Min. geschlossen sein, hat man die ganze Zeitperiode auf XV Klassen geteilt, welche ungleiche Zeitabschnitte umfassten. Solche Einteilung wurde nur deshalb vorgenommen, weil die Beobachtungen aufwiesen, dass die erste Periode des Experimentes zeichnete



sich mit den wesentlichsten und charakteristischen Verlauf des Aufhörens der Kontraktilität aus, während die weiteren Perioden wiesen — im allgemeinen — eine lang anhaltende Oszillation um einige konstante Werte. Die Ergebnisse bestätigen die von W a r z y ń c z y k 1937 gegebene Tatsachen nicht, und geben zugleich auch keine Antwort warum — ohne andere Reizstärke nachzuprüfen — hat er diese ausgewählt.

Tabelle 3

Die Differenzen in den mittleren Zahlen der Kontraktionen in den aufeinanderfolgenden Minuten für die Reizstärke 1600, 3200 und 4800 erg zusammengerechnet (in %)

Zeit in Min.	Die mittlere Zahlen der Kontraktionen	Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen.
1	88.0	—
2	76.7	11.3 **
3	66.7	10.0 *
4	60.0	6.7
5	50.0	10.0 *
6	47.3	2.7
7	35.3	12.0 **
8	36.0	0.7
9	30.7	5.3
10	27.3	3.4
11	22.7	4.6
12	23.3	0.6
13	18.0	5.3
14	13.3	4.7

$P = 0.99$ ;  $m_r \cdot t_{0,01} = 10.2\%$ ;  $P = 0.95$ ;  $m_r \cdot t_{z,05} = 7.9\%$

Bei dieser Reizstärke (ca 20 000 erg!) die untersuchten Individuen hören mit ihren Kontraktionen nicht auf. Die Zahl der Kontraktionen vermindert sich von Anfang plötzlich, dann aber langsam und zum völligen Aufhören der Kontraktionen kommt es nicht an.

Es ist möglich, dass auser Reizstärke wirken hier auch andere Faktoren, was scheinen die sehr oft hier vorkommende Krampfstände und Tod einiger Individuen zu bestätigen, aber diese Frage wird an anderer Stelle ausführlicher besprochen.

Auf Grund der durchgeführten Experimente und ihrer statistischen Bewertung kann man eine allgemeine Wesenheit des Einflusses der Reizstärke auf die Kontraktilität von *Spirostomum ambiguum* bestätigen, und besonders die folgende Tatsachen:

- a. die Zahl der Kontraktionen in jeder Minute des Experimentes um so höher ist, wie grösser ist die Reizstärke,
- b. mit der Vergrößerung der Reizstärke auch die Reaktivitätszeit der Proctisten verlängert sich sehr deutlich,

c. unabhängig von der Reizstärke vermindert sich mit der Zeit die Zahl der Kontraktionen,

d. der Verlauf des Erlöschens der Kontraktionen weist den gewaltsamsten Charakter in den ersten Minuten des Experimentes auf,

e. mit der Vergrößerung der Reizstärke vermindert sich die Planmässigkeit in dem Aufhören der Kontraktilität.

### Der Einfluss der Reizfrequenz

In den vorgeführten Versuchen hat man bei der Reizstärke 1600 erg die in der Tabelle 4 gegebene Frequenzen angewandt:

Tabelle 4

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen bei verschiedener Reizfrequenz (in %)

Die Reizfrequenz. Zeit in Min.	1/Min.	5/Min.	10/Min.	15/Min.	Σ	20/Min.
1	100	92	80	50	322	20
2	100	60	62	40	262	40
3	100	56	56	36	248	16
4	100	44	36	20	200	6
5	80	32	22	16	150	2
6	100	28	18	12	158	—
7	100	20	10	8	138	6
8	100	12	8	10	130	—
9	100	16	8	4	128	8
10	100	12	6	2	120	6
Σ	980	372	306	198	1856	—

Bei der Anwendung der Frequenz 20 pro Min. hat man ganz unregelmässigen Verlauf des Aufhörens der Kontraktilität beobachtet, sogar nach lang andauernder Reizung so, dass diese Frequenz wurde in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt. Bei der Anwendung der Frequenz 1 pro Min. reagieren die Protisten durch lange Zeit auf jede Erschütterung des Mediums. Das Fehlen der Reaktion gehört hier eher zu den Ausnahmen.

Es geht aus der statistischen Analyse hervor, dass zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen, bei der untersuchten vier Frequenzen des Reizes, beobachtet man wesentliche Differenzen, welche keinen zufälligen Charakter aufweisen.

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen auf die Zeiteinheit, bei der Berücksichtigung verschiedener Frequenzen des Reizes, verminderte sich wesentlich mit der Erhöhung der Frequenz.

In allgemeinen — je grössere Reizfrequenz, desto kleiner in derselben Zeit ist die Zahl der Kontraktionen für alle angewandte Frequenzen gemessen. Man stellt auch die Wesenheit der Differenzen zwischen den mittleren

Zahlen der Kontraktionen in jeder Minute des Experimentes für alle angewandte Frequenzen fest. Bei den Frequenzen 5/Min., 10/Min., 15/Min, ist das Aufhören der Kontraktionen mit dem Zeitverlauf sogar so deutlich, dass die weitere Analyse scheint hier nicht mehr nötig sein.

Eingehender möchten wir nur die Prüfung der Wesenheit zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen für jede von den angewandten Reizfrequenzen durchzuführen und angeben.

Diese Zahlen gestalten sich entsprechend (in ‰):

für die Reizfrequenz	1/Min. — $x_1 = 98.0$
” ” ”	5/Min. — $x_2 = 37.2$
” ” ”	10/Min. — $x_3 = 30.6$
” ” ”	15/Min. — $x_4 = 19.8$

Davon berechnete Differenzen zwischen diesen mittleren Zahlen betragen (Tabelle 5).

Tabelle 5

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen auf die Minute für die Reizfrequenz 1, 5, 10, 15, pro Min. (in ‰)

Die mittlere Zahlen für die Frequenz:		$x_1$ 98.0	$x_2$ 37.2	$x_3$ 30.6	$x_4$ 19.8
Die Differenzen	$x_1$	0	60.8**	67.4**	78.2**
	$x_2$	—	0	6.6**	17.4**
	$x_3$	—	—	0	10.8**

$$P = 0.95; m_r \cdot t_{0,05} = 4,9\%$$

$$P = 0.99; m_r \cdot t_{0,01} = 6,32\%$$

Um die Regelmässigkeiten in dem Erlöschen der Kontraktionen genauer zu untersuchen, hat man hier statistisch eingehender die zwei Frequenzen 5/Min. und 10/Min. geprüft. Die Zeit des Experimentes haben wir auf 13 Min. beschränkt, denn praktisch in dieser Zeit hören schon die Kontraktionen der untersuchten Tiere auf.

Das Aufhören der Kontraktionen verläuft mit der Zeit des Experimentes bei beiden Reizfrequenzen fast parallel, und seine verschiedene Niveaus scheinen nur von ihnen abhängen (Tabelle 6).

Weil die Differenz zwischen den durchschnittlichen Zahlen der Kontraktionen beträgt für beide Frequenzen 4.3‰ ( $P > 0.99$ ) stellen wir fest, dass bei der Reizfrequenz 10/Min üben die Protisten durchschnittlich wirklich weniger Kontraktionen aus, als bei der Reizfrequenz 5/Min.

Die Untersuchung der wesentlichen Differenzen zwischen den Zahlen der Kontraktionen in jeder Minute des Experimentes zeigt uns, dass die grosse

Unterschiede in der Reaktion der Protisten nur in den ersten sechs Minuten vorkommen. In den nächsten Minuten, vermindern sie sich, laufen einigermassen zusammen und sind schon nicht mehr wesentlich (Tabelle 7).

Tabelle 6

Die durchschnittliche Zahlen der Kontraktionen für die Reizfrequenz 5 und 10 pro Min. (in %)

Reizfrequenz	5/Min.	10/Min.	$\Sigma$
Zeit in Min.			
1	92.0	80.0	172.0
2	60.0	59.0	119.0
3	56.0	46.0	102.0
4	42.0	33.0	75.0
5	32.0	32.0	55.0
6	30.0	19.0	49.0
7	18.0	12.0	30.0
8	10.0	10.0	20.0
9	16.0	8.0	24.0
10	10.0	4.0	14.0
11	6.0	3.0	9.0
12	4.0	1.0	5.0
13	4.0	0.0	4.0
$\Sigma$	380.0	300.0	680.0

Tabelle 7

Die Differenzen zwischen der Zahl der Kontraktionen für beide Reizfrequenzen in jeder Minute gemessen (in %)

Zeit in Min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Differenz in der Zahl der Kontraktionen	12**	1	10**	9**	9**	11**	6	0	8**	6	3	3	4

$$P = 0,99; m_r \cdot t_{0,01} = 7.5\%$$

Um an die Abhängigkeit des Aufhörens der Kontraktionen von der Zeit der Reizwirkung näher zu kommen, hat man die Differenzen in der Zahl der Kontraktionen in der aufeinander folgenden Zeitperioden durchschnittlich für beide Reizfrequenzen durchgeprüft (Tabelle 8).

Weil wir hier das Sinken der Zahl der Kontraktionen mit dem Zeitverlauf feststellen können, können wir auch nachweisen, dass das Sinken am stärksten in den ersten fünf Minuten ist, dann ist es kleiner und in den dreizehnten —

Tabelle 8

Die Differenzen zwischen den einzelnen Zeitperioden durchschnittlich für beide Reizfrequenzen (in %)

Zeit in Min.	Durchschn. Kontraktionszahl	Differenz
1	86.0	—
2	59.5	26.5**
3	51.0	8.5**
4	37.5	13.5**
5	27.5	10.0**
6	24.5	3.0
7	15.0	9.5**
8	10.0	5.0
9	12.0	2.0
10	7.0	5.0
11	4.9	2.5
12	2.5	2.0
13	2.0	0.5

$$P = 0.99; m_r \cdot t_{0.01} = 5.4 \%$$

Tabelle 9

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen für die Reizfrequenzen: 6, 12 und 18 pro Min. (in %)

Die Reizfrequenz	6/Min.	12/Min.	18/Min.	$\Sigma$
Die Zeitperioden				
I 0—1 Min.	95.00	92.00	80.00	267.00
II 1—3 Min.	92.00	81.00	67.00	240.00
III 3—6 Min.	82.00	75.00	63.00	220.00
IV 6—10 Min.	75.00	68.00	53.00	196.00
V 10—15 Min.	65.00	64.00	34.00	163.00
IV 15—20 Min.	59.00	57.00	28.00	144.00
VII 20—25 Min.	56.00	54.00	24.00	134.00
VIII 25—30 Min.	52.00	53.00	23.00	128.00
IX 30—40 Min.	49.00	48.00	19.00	116.00
X 40—50 Min.	47.00	36.00	17.00	100.00
XI 50—60 Min.	54.00	29.00	16.00	89.00
XII 60—90 Min.	35.00	24.00	14.00	73.00
XIII 90—120 Min.	30.00	20.00	13.00	63.00
XIV 120—150 Min.	24.00	18.00	10.00	52.00
XV 150—180 Min.	20.00	17.00	9.00	46.00
$\Sigma$	825.00	736.00	470.00	2031.00

fünfzehnten Minuten zum völligen Aufhören führt. Die wesentlichsten Unterschiede zwischen beiden Reizfrequenzen beobachtet man in der ersten Phase des Experimentes. Mit dem Zeitverlauf sind die Reaktionen der Tiere bei beiden Frequenzen immer mehr zusammenlaufend und fast in derselben Zeit erlöschen.

Die Anwendung der oben gegebenen Untersuchungsbedingungen weist in dem Aufhören der Kontraktionen einen adaptativen Charakter dieser Erscheinung auf und führt zum relativ schnellen, völligen Erlöschen der Reaktionen der Tiere auf die sich rhythmisch wiederholende Erschütterungen des Mediums.

Man muss anmerken, dass der frei abfallende Tropfen manchmal eine Wegwerfung des Individuums auf einige Millimeter verursacht ohne dabei eine Kontraktion herauszurufen.

In anderen Experimenten hat man die von W a r z y ń c z y k 1937 angegebene Methode (Reizstärke: ca 20 000 erg, Reizfrequenz: 6, 12 und 18 pro Min.) angewandt, welche das Überprüfen der Kontraktionsschwundes in längeren Zeitperioden ermöglichte.

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen und die Differenzen zwischen ihnen weisen auf, dass mit der Vergrößerung der Frequenz des Reizes, sehr wesentlich die Zahl der Kontraktionen sich vermindert.

Tabelle 10

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen und die Differenzen zwischen ihnen (in %)

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen für jede Reizfrequenz	Die Differenzen zwischen diesen mittleren Zahlen
$x_1$ (6/Min.) = 55.00	$x_1 - x_2 = 5.93^{**}$
$x_2$ (12/Min.) = 49,07	$x_1 - x_3 = 14.67^{**}$
$x_3$ (18/Min.) = 31,33	$x_2 - x_3 = 17.74^{**}$

$$P = 0,99; m_r \cdot t_{0,01} = 1.31\%$$

Tabelle 11

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen für alle angewandte Reizfrequenze (in %)

Die Zeitperioden	Kontraktionszahlen	Die Zeitperioden	Kontraktionszahlen
I	89.00	IX	38.67
II	80.00	X	33.33
III	73.33	XI	29.67
IV	65.33	XII	24.33
V	54.33	XIII	21.00
VI	48.00	XIV	17.33
VII	44.67	XV	15.33
VIII	42.67		

Das Überprüfen der Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen für alle drei angewandte Reizfrequenzen in den einzelnen Zeitperioden weist auf, dass das Aufhören der Kontraktionen schreitet mit dem Zeitverlauf deutlich und ganz wesentlich auf, und dazu ist es von der Reizfrequenz unabhängig.

Tabelle 12

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen (in ‰)

$x_1 - x_2$	9.00**	$x_6 - x_7$	3.33**	$x_{11} - x_{12}$	5.34**
$x_2 - x_3$	6.67**	$x_7 - x_8$	2.00	$x_{12} - x_{13}$	3.33**
$x_3 - x_4$	8.00**	$x_8 - x_9$	4.00**	$x_{13} - x_{14}$	3.67**
$x_4 - x_5$	11.00**	$x_9 - x_{10}$	5.34**	$x_{14} - x_{15}$	2.00
$x_5 - x_6$	6.63**	$x_{10} - x_{11}$	3.67**		

$$P = 0.99; m_r \cdot t_{0,01} = 3.04\%$$

$$P = 0.95; m_r \cdot t_{0,05} = 2.36\%$$

Für alle angewandte Reizfrequenzen beobachtet man in dem Verhalten der Protisten charakteristische drei Phasen. Die erste Phase (bis VII—VIII Zeitperiode) kennzeichnet sich mit einem gewaltigen Herabsinken der Zahl der Kontraktionen, welches am grössten für die höchste Reizfrequenz ist. Das Aufhören der Kontraktionen und das allgemeine Verhalten ähnelt einigermaßen in dieser Periode an das Verhalten der Protisten bei den Untersuchungen mit dem frei abfallenden Tropfen. Die zweite Phase (bis XII Zeitperiode) kennzeichnete sich mit einem sanftmütigen Sinken der Zahl der Kontraktionen, doch aber deutlich noch verschiedenen für jede der Reizfrequenzen.

In der dritten Phase, im allgemeinen, bleiben die Zahlen der Kontraktionen durch längere Zeitperioden fast auf demselben — für jede Frequenz verschiedenen — Niveau, nur mit schwach merkbarer Tendenz zum weiteren Herabsinken. Das völlige Aufhören der Kontraktilität konnte man aber auch bei der Verlängerung des Experimentes bis 420 Min. nicht erreichen. Die untersuchten Individuen weisten immer öfters die charakteristische Krampfzustände auf und reagierten schwach, oder sogar nicht, auch auf qualitäts andere Reize. Diese Krampfzustände traten immer in der dritten Phase hervor und um so schneller und deutlicher, je höher war die Reizfrequenz. Man konnte sie niemals in der ersten Phase und in den mit dem frei abfallenden Tropfen durchgeführten Experimenten beobachten.

Alle hier durchgeführte Versuche erlauben uns auf folgende Schlüsse:

a. Zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen bei den angewandten Reizfrequenzen treten wesentliche Differenzen, welche keinen zufälligen Charakter aufweisen.

b. Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen auf die Zeiteinheit vermindert sich wesentlich mit der Erhöhung der Reizfrequenz.

c. Unabhängig von der Reizfrequenz vermindert sich mit dem Zeitverlauf die Zahl der Kontraktionen.

d. Bei allen angewandten Reizfrequenzen beobachtet man die gewaltigste Verminderung der Kontraktilität in den ersten Phasen des Experimentes.

### Die Kontrollversuche und Diskussion

Die oben besprochene Experimente waren bei der Anwendung von zwei grundsätzlich verschiedener Untersuchungsmethoden durchgeführt. Eine von ihnen war „die Methode des frei abfallenden Tropfens“, also für die Tiere eines biologisch unschädlichen, gleichgültigen Reizes, welchen sie auch in der Natur begegnen können (z.B. der Regen). Das relativ grosse Volumen des Mediums in dem Glasgefässchen, wie auch sein ständiges, allmähliches Durchfliessen und Austausch, haben den event. Einfluss von den Stoffwechselprodukten während der Versuche ausgeschlossen. Ausserdem prüfte man die Reaktivität der untersuchten Individuen in jeder Periode des Experimentes auf qualitativ andere Reize (z.B. das unmittelbare Berühren mit stumpfen Glasnadel, oder das Berühren der Mediumsoberfläche mit einer tönenden Stimmgabel usw.). In allen Fällen weisten die Kontrolltiere das normale Verhalten und normales Reaktionsvermögen — sie kontrahieren auf jeden Reiz. In diesen Verhältnissen hat man auch niemals o.e. Krampfstände beobachtet. Auch die Tiere, auf welchen hat man experimentiert, und welche mit den Kontraktionen aufgehört hatten, reagierten sofort mit den Kontraktionen auf jeden qualitativ anderen Reiz, so auf den stärkeren, wie auch schwächeren.

Diese Umstände scheinen einen Einfluss von event. anderen Nebenfaktoren auf das allmähliche Aufhören der Kontraktionen auszuschliessen.

Tabelle 13

Die Reaktionen der Kontrolltiere von der Zeit des eigentlichen Experimentes abhängig (in %)

Die Experimentdauer	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.
Die Zahl der Kontraktionen durchschnittlich von 10 Min. Reizung.	78	70	65	62	58	52

Ganz anders stellt sich die Sache mit der Anwendung der zweiten Methodik dar, was uns zur Einstellung verschiedenen Kontrollversuche zwang.

a. Gleichzeitig mit allen so durchgeführten Experimenten hat man einzelne Individuen in derselben Untersuchungsverhältnissen (nur ohne Reizung) gehalten. Nach dem eigentlichen Experiment hat man die Kontrolltiere durch 10 Min., so wie die Versuchstiere gereizt und die Ergebnisse verglichen (siehe Tabelle 13, beispielweise für die Frequenz 12/Min. angegeben).

Es ist — in solchen Versuchsbedingungen — genug ersichtlich, dass schon von Anfang an die Kontrolltiere weisen eine verminderte (im Vergleich zu Normalen) Reaktivität auf. Es wird verständlich erscheinen, wenn man berücksichtigt, dass in einem Tropfen Wasser oder Medium sammeln sich (und verdichten) durch längere Zeit die Stoffwechselprodukte an, welche das Verhalten der Protisten wesentlich beeinträchtigen können, was die folgende Versuche bestätigen.

b. In das Medium, in welchem hat man ein Individuum z.B. durch 180 Min. gereizt, hat man ein neues Individuum aus der Kultur hineingelassen und



auch z.B. 180 Min. gereizt. In allen solchen Fällen die Kurve des allmählichen Erlöschens der Kontraktionen befand sich unter solcher Kurve des vorher gereizten Individuums, und die Kontrolltiere wiesen immer öftere und früher antretende Krampfstände auf.

c. Um näher an die Ursache der Verminderung der Reaktivität der Tiere zu kommen, haben wir, nach Beendigung des Experimentes, die Protisten mit einem qualitativ anderen Reiz stimuliert — mit dem unmittelbaren Berühren des Körpers. Von Anfang an reagieren die Tiere auf den neuen Reiz — im Grunde — überhaupt nicht (um so länger, je länger dauerten die vorherige Versuche und je höher die angewandte Frequenz war). Die erste Reaktionen zeigten sich bei der Berührung der vorderen Teil des Körpers, dann der hinteren, und erst später konnte das Tier mit vollen Kontraktionen den Reiz zu beantworten. Die grössere Reaktivität des verderen Teiles von *Spirostomum*, so auf die kathodische, wie anodische Reize hat auch Grebecki 1963 festgestellt.

d. Ausserdem hat man noch die Frage des Wiederkehrens des normalen Kontraktionsvermögen bei den gereizten Tieren untersucht. Wir haben, nach dem beendeten Versuch, jedes Individuum jede 5 Minuten mit 10 einzelnen Erschütterungen durch 30 Min. gereizt.

Tabelle 14

Das Wiederkehren der Kontraktilität nach 180 Min. Reizung (in %)

Zeit in Min.	5	10	15	20	25	30	Die Mittlere von den 10 ersten Erschütterungen in dem Experiment
Die Kontraktionszahl	27	33	40	41	48	65	93

Diese Ergebnisse weisen ein langsames Wiederkehren des Kontraktionsvermögens auf den angewandten Reiz, welches in der 30 Min. nach der Beendigung des Experimentes erst 65% (und in der 90 Min. — 75%) der maximal möglichen Kontraktionen beträgt.

Die durchgeführte Kontrollversuche, so wie auch die Analyse des Einflusses der Stärke und Frequenz des Reizes auf das Aufhören der Kontraktionen bei *Spirostomum*, scheinen eindeutig aufzuweisen, dass die Anwendung der durch Wawrzyńczyk 1937 angegebener Methode kann uns einen wirklichen Bild dieser Erscheinungen nicht geben. Solche Untersuchungsverhältnisse scheinen abiologisch sein und weichen von den natürlichen weit ab, dh, von solchen, welche dem Tiere in der Natur entgegnetreten können. Schon der lange Aufenthalt in einem Tropfen des Mediums (180 Min. u. mehr) scheint einige physiologische Störungen bei den Protisten zu verursachen. Vor allem sehen wir hier das stark herabgesetzte Bewegungsvermögen und oft antretende — manchmal sogar unumkehrbare — Krampfstände. Also Zustände, welche — wie man feststellen konnte — können immer und relativ schnell durch das Einführen in das Medium der chemisch schädlichen

Faktoren hervorgerufen werden. Solche Verhältnisse üben einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktivität der Protisten aus, auf das Kontraktionsvermögen bei Anwendung des mechanischen Reizes. Nur dank der enorm grossen Stärke des Reizes konnte man — in diesen für das Tier biologisch anormalen Verhältnissen — die unreguläre, lang anhaltende, Kontraktionen beobachten. Die Zahl der Kontraktionen verminderte sich allmählich mit dem Zeitverlauf, aber doch parallel mit der Erschöpfung der allgemeinen Lebenskraft des Tieres (das langsame Wiederkehren zum normalen physiologischen Zustand, das Fehlen oder stark geschwächte Reaktion auf qualitativ andere Reize usw.).

Darüber, dass die biologisch schädlich einwirkende Bedingungen sehr wesentlich das Kontraktionsvermögen beeinträchtigen können, scheint uns auch das zu überzeugen, dass die Protisten, welche in das Medium mit schädlich einwirkenden Faktoren eingeführt wurden (z.B. die Aufsäuerung des Mediums) in die Vorkampf- oder Krampfstände geritten. In solchen Verhältnissen schwach rhythmisch gereizt (z.B. 1600 erg) unregulär oder sogar überhaupt nicht reagierten. Deshalb meinen wir, dass der normale Verlauf des Erlöschens der Kontraktionen wurde hier sehr stark durch die eintretende Ermüdung des Tieres und darauf folgende und dazu sich anschliessende Selbstvergiftung herabgesetzt und beeinträchtigt, was die eigentliche Analyse der Erscheinung unmöglich macht.

Ganz anders stellt sich die Sache bei der Beibehaltung der optimalen Mediumsverhältnisse und der Anwendung der schwachen, für das Tier biologisch gleichgültigen Reize dar. Diesen Bedingungen tut die Methode „des frei abfallenden Tropfens“ genug, bei welcher die untersuchten Protisten in jeder Experimentsphase die physiologisch normale Leistungsfähigkeit und das Kontraktionsvermögen beibehalten und aufweisen.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen können wir vor allem eine allgemein-gültige Regelmässigkeit feststellen: Unabhängig von der Reizstärke und Reizfrequenz kommt es zum allmählichen Aufhören der Kontraktionen, zu einer Verminderung der Zahl der Kontraktionen auf die Zeiteinheit. Diese Erscheinung beobachtet man im wesentlichen Sinne bei allen Versuchen, und ihrer Verlauf hängt eben von den erwähnten Faktoren ab.

Bei der Anwendung von 1600 erg starken Reiz und seiner Frequenz 10/Min. erreicht man — in normalen Mediumsverhältnissen — das völlige Erlöschen der Kontraktionen durchschnittlich um die 15 Minute des Experimentes. Unter dem „völligen Erlöschen“ verstehen wir das Nichtbeantworten der rhythmisch weiter einwirkenden Reize mit keiner einzigen Kontraktion während der nächsten — wenigstens 10 Min. des Experimentes.

Mit der Vergrösserung der Reizstärke oder Erhöhung der Reizfrequenz, oder sogar diesen beiden Faktoren, verlängerte sich sehr wesentlich die Zeit des Reagierens der Protisten.

In allen Versuchen das wesentlichste Herabsinken der Zahl der Kontraktionen beobachtet man in der ersten Phase des Experimentes. Man stellt hier auch deutlich die Abhängigkeit dieses Herabsinkens von der Reizstärke und Reizfrequenz fest. Je grösser sind diese Faktoren, desto gewaltigste ist in dieser Phase das Sinken der Zahl der Kontraktionen. Mit dem Zeitverlauf gleichen sich diese Differenzen aus, weisen immer grössere Aufnäherung auf und verlieren ihre Wesenheit.

Diese Erscheinung — das Aufhören der Reaktionen unter dem Einfluss der sich rhythmisch wiederholenden Reizen ist in dem Tierreiche sehr verbreitet und wurde — in allgemeinen — als die Gewöhnung an die einwirkende Reize mittels der Hemmung der eingeborenen Reaktionen betrachtet.

Die von uns erzielte Ergebnisse scheinen mit diesen, welche durch die andere Autoren angegeben wurden, im Grunde übereinstimmen. So z.B. Danisch 1921 gibt an, dass *Vorticella nebulifera* ähnlich wie *Spirostomum* schon auf sehr schwache Reize (ca 180 erg) reagierte. Das Vermögen des Gewöhnens an den wirkenden Reiz vergrössert sich proportional zu seiner Stärke. Über 2000 erg findet bei *Vorticella nebulifera* keine Gewöhnung mehr statt. Es ist auch schwer das Aufhören der Reaktionen zu erzielen, wann die Zeitabstände zwischen zwei aufeinander folgenden Reizen zu gross (z.B. jede 20—25 Sek.) oder zu klein (z.B. jede 3—5 Sek.) sind. Das kommt auch bei *Spirostomum* vor, wann der Reiz seltener als je 15—20 Sek. oder öfters als 5 Sek. wirkt.

Zu grosse Reizfrequenz führte gewisse Störungen in das Verhalten von *Spirostomum* ein. Von Anfang an beantwortete das Tier nicht jeden Reiz — man beobachtet keine Regelmässigkeit, und die Zeit des Experimentes verlängerte sich bedeutend. Dasselbe beobachtet man bei der Anwendung von schwächeren Reiz als Optimum (1600 erg) mit gleichzeitig höherer Reizfrequenz. Diese Erscheinung scheint eine Analogie mit der Summation der Reize in dem Nervensystem und der Reaktion „Alles oder Nichts“ aufzuweisen. *Spirostomum* reagiert nicht auf eine Reihe aufeinander folgenden, schwachen Reize, welche mit hohen Frequenz dosiert sind, um dann auf einmal sich kontrahieren. Ähnliches Verhalten haben bei *Vorticella* Danisch 1921 und Fortner 1926, bei *Zoothamnium Koltzoeff* 1911, bei *Carchesium lachmani* Plavilstchikov 1928 und bei *Amoeba proteus* Folger 1926 beobachtet. Die Summation der schwachen elektrischen Reize auf die Wimperaktion bei *Paramecium caudatum* hat auch Kinoshita 1938 festgestellt. Ausserdem Folger stellte fest, dass die Amoebe auf mechanische Reize dem Weber-Fechner'schen Gesetz gemäss reagierte, dh., dass die Reizstärke welche zur Herausrufung einer Reaktion unentbehrlich ist, ist proportional zu der Stärke des zuvorigen Reizes. Diese Regelmässigkeit kann man, einigermaßen auch bei *Spirostomum* feststellen. Das Individuum bei welchem die Reaktionen auf die Reize z.B. 800 erg aufhörten, auf den stärkeren Reiz (z.B. 1600 erg) sofort kontrahieren.

Wenn wir *Spirostomum* mit dem Reiz 800 erg bis völligem Erlöschen der Kontraktionen reizen, und — ohne das Experiment zu unterbrechen — verdoppeln wir die Reizstärke, dann beginnt das Tier wieder mit Kontraktionen den neuen Reiz zu beantworten. Die Reaktion dauerte jedoch viel kürzer und die Zahl der Kontraktionen in jeder Zeiteinheit immer kleiner ist, als bei der Reizung nur mit dem stärkeren Reiz. In der umgekehrten Situation es fehlt — im Grunde — eine Reaktion, doch aber wenn vergrössert man den Zeitabstand zwischen aufeinander folgenden Reizen, dann beginnt das Tier wieder zu kontrahieren — man konnte keinen Einfluss des zuvorigen Reizes feststellen, ob er stärker oder schwächer war.

Es geht daraus hervor — was auch für die Amoebe Folger behauptete — dass der schwächere Reiz kann einigermaßen die Reaktion auf stärkeren hemmen. Bei der Vergrösserung der Unterschiede in der Reizstärke oder

bei der Anwendung beider starken, oder schwachen Reize, tritt diese Erscheinung nicht auf.

Das Weber-Fechner'sche Gesetz kann hier aber ganz allgemeinen, begrenzten und relativen Wert haben, denn — wie schon Weizsäcker 1926 unterstrich — es ist schwer und ganz unsicher die genaue mathematische Begriffe zu den Erscheinungen der Erregbarkeit anzuwenden. Ausserdem dieses Gesetz empirisch sehr begrenzt ist und täuscht bei den zu schwachen oder zu starken Reizen.

Alle oben besprochene Erscheinungen finden nur in den normalen Verhältnissen statt, in welchen konnte man den event. Einfluss der Intoxikation oder Ermüdung ausschliessen. Weil die schädliche Einwirkungen des Mediums — im Sinne äusserlichen Faktoren — ganz verständlich sind, lassen wir sie bei unseren Erwägungen an der Seite. Doch die Frage der Ermüdung und ihrer Einflusses auf die Reaktionen von *Spirostomum* eine kurze Erwähnung erfordert. Die Ermüdung, als eine allgemeine biologische Erscheinung, muss unbedingt jede Arbeitsleistung begleiten. Doch muss man hier verschiedene Stufen der Ermüdung unterscheiden, welche in grundsätzlich wesentlicher Weise von den Verhältnissen in welchen diese Arbeit ausgeführt wurde, wie auch von den individuellen Eigenschaften und der phylogenetischen und unmittelbaren Vergangenheit der Tiere abhängen werden.

Joteyko 1932 unterscheidet vier solche Stufen, und während die erste — ganz leichte Ermüdung — wirkt nach bestimmter Ruhepause sogar einigermaßen tonisierend, und in diesem Sinne kann sogar für den Organismus vom Nutzen sein, dann die weitere Stufen der Ermüdung zu einer Verminderung der Leistungsfähigkeiten und weiter zu der unwiederkehrbaren pathologischen Zuständen und Tod führen können. Die erste Stufe der Ermüdung kann sogar stimulierend einwirken und ist der unentbehrliche Faktor jeden Training — wie Missiuro 1947 behauptete. Doch, wenn die Ruhe-, die Erholungspausen zu kurz werden, beginnt die Ermüdung sich zu kummulieren, eine Warnung für den Organismus zu sein, welche zugleich bestimmte kinetophilaktische Tätigkeit für den Schutz der Zone der Bewegungserscheinungen auslöst. Weitere Kummulation der Ermüdung führt zur Übertragung ihrer Erscheinungen von der Peripherie zum Zentrum und die — mit der Zeit unwiederkehrbare — Veränderungen verursacht.

Solche Erscheinungen treten auch ziemlich deutlich bei *Spirostomum* auf. Höhere als 15/Min. Reizfrequenz (bei 1600 erg) führt zu den Unregelmässigkeiten und Störungen in dem allgemeinen Verhalten. Hier haben wir höchstwahrscheinlich mit einer Probe der Autoregulation der Reflexe zu tun, welche vor allem den Schutz der Zone der Bewegungserscheinungen, dann des ganzen Organismus zur Ziel hat.

Alle Stufen der Ermüdung sind in den Versuchen, welche methodisch nach Wawrzyńczyk 1937 durchgeführt wurden feststellbar. Die, schon von Anfang an, bei so starken Reiz (ca 20 000 erg) antretende Ermüdung verursacht in der ersten Experimentphase eine Steigerung der Erregbarkeit, welche sich in der heftigeren Bewegungsweise und relativ grösseren Zahl der Kontraktionen äusserte. Dann beobachtet man deutlich die kinetophilaktische Reaktion, welche drückt sich vor allem in der Verminderung der Bewegungsaktion aus. Das Nichtreagieren — in dieser Phase — auf jeden Reiz (Erschütterung) bei gleichzeitiger Fähigkeit die qualitativ andere Reize zu bean-

worten, scheint auch ein Selbstschutz der Zone der Bewegungserscheinungen von der herantretenden Ermüdung darzustellen. Die weitere Stufe charakterisiert sich mit den Krampfzuständen, und dem Fehlen der Kontraktionen auf qualitativ andere Reize. Das Unterbrechen der Experimente in diesem Stadium kann zur allmählichen Erholung der Tiere und Wiederkehren der normalen Reaktionsfähigkeit führen; die Verlängerung kann die unwiederkehrbare Veränderungen und den Tod verursachen.

Die Gewöhnung an den rhythmisch einwirkenden Reiz kann also — ausser den o.e. „optimalen Untersuchungsverhältnissen“ — nur bei der Anwendung geeigneter Erholungspausen (Reizfrequenz) stattfinden, sonst wird auf den ersten Plan die sich allmählich vertiefende Ermüdung kommen, denn die Ergebnisse der Einwirkung von allen mechanischen Reizen müssen sich doch in den Grenzen der Ermüdung und Gewöhnung finden.

Die Tatsache, dass die entsprechenden Pausen in der Reizung können völlig die Ermüdungserscheinungen beseitigen, scheinen wenigstens folgende Beispiele zu bestätigen:

Der abgesonderte Froschmuskel ist praktisch sogar nach 10—12 000 einzelner Kontraktionen unermüdlich, wenn die Frequenz des Reizes nicht höher als 3—5 pro Sek. beträgt. Der 3 Sek. Rhythmus der Erregung der Atemmuskulatur bei dem Menschen auch nicht zur Ermüdung führt und dem Herzmuskel genügt sogar weniger als einsekundige Pause zwischen den Tätigkeitsperioden. 10 — sekundige Pause ist eine ausreichende Erholung für die Muskeln des mittleren Fingers, welcher die Kontraktionen in einem Ergograph ausübte. Bei allen diesen Analogien müssen wir doch in Acht haben, dass die Reaktionen von *Spirostomum* als einen ganzen Organismus können und müssen etwas verschieden von den Automatismen der isolierten Muskeln sein.

Die Ermüdung steigert in wesentlicher Weise: die enorme Schnelligkeit (Frequenz), solche Stärke und lange Zeit des Einwirkens; die Zusammenballung aller drei Faktoren muss — wie Lagrange 1912 behauptet — für jeden Organismus verderbenbringend sein.

Mit der Vertiefung der Ermüdung beobachten wir in der Physiologie des Muskels das Hervortreten der Krampfzustände welche als die Verlängerung der einzelnen Kontraktion, als die Erscheinung der verheimlichten Summation gedeutet wurde. Eine analogische Erscheinung finden wir auch bei *Spirostomum*, wo solche Krampfzustände können durch verschiedene Faktoren und u.a. auch durch zu grosse Stärke und zu hohe Frequenz des Reizes verursacht werden.

Also, wenn wir die Frage, ob bei dem Aufhören der Kontraktionen bei *Spirostomum* handelt es sich nicht um eine Ermüdung — beantworten wollen, dann müssen wir feststellen, dass in geeigneten Verhältnissen der Einfluss der Ermüdung ganz unwesentlich ist. Aber wenn einer oder mehr von den Parametern des Experimentes die Schädlichkeitsstufe überschreiten wird, dann beginnt die Rolle der Ermüdung wesentlich sein und auf den ersten Plan kommen, und statt normalen beginnen wir die pathologische Erscheinungen zu beobachten.

Wie schon erwähnt wurde, fast alle Forscher, welche diese Frage an Protisten untersucht hatten, haben, im Grunde, schwache Reize angewandt. Nur

in solchen Verhältnissen hat man die Gewöhnung an den einwirkenden Reiz und sogar in der kurzen Zeit beobachten können (Jennings 1899, Fortner 1926, Folger 1926, Müller 1926, Hempelmann 1926 u.a.)

Von den angeführten Untersuchungen, so wie aus den Arbeiten anderer Forscher, ergibt sich ziemlich einheitliches Bild. *Spirostomum*, so wie auch andere kontraktionsfähige Protisten, und auch einige systematisch höher stehende Vertreter des Tierreiches, hören auf — in den für sie normalen Verhältnissen — die nicht zu starke und nicht zu oft antretende Reize mit den Kontraktionen zu beantworten; sie gewöhnen an den einwirkenden Reiz. Eine andere Frage — welche wir an dieser Stelle nicht errötern möchten — ist, ob man die Gewöhnung als eine Form des Lernens betrachten kann.

### Zusammenfassung

Das Untersuchungsobjekt war *Spirostomum ambiguum*, welches sich mit grossem Kontraktilitätsvermögen unter dem Einfluss von verschiedenen Reizen auszeichnete. In den Untersuchungen hat man die Methode des frei abfallenden Tropfens angewandt, welche die Erschütterungen des Mediums mit der Kraft von 400—4800 erg hervorruft bei gleichzeitiger Frequenz des Reizes von 5—20/Min. In anderen Experimenten hat man die Reizstärke 20000 erg angewandt. In allen Fällen hat man den wesentlichen Einfluss von Reizstärke und Frequenz festgestellt. Unabhängig von diesen beiden Faktoren konnte man auch das Aufhören der Kontraktionen mit dem Zeitverlauf des Experimentes beobachten. Das allmähliche Aufhören der Kontraktionen hat man als die Gewöhnung an den rhythmisch einwirkenden Reiz anerkannt. Bei den schwachen Reizen, welche mit bestimmter Frequenz einwirken, konnte man den Einfluss der Ermüdung auf das Aufhören der Kontraktionen als ganz unwesentlichen ausschliessen. Bei den starken Reizen und hoher Frequenz kommt auf den ersten Plan die Ermüdung, welche zu den pathologischen Zuständen führen kann und in wesentlicher Weise die Untersuchungsergebnisse beeinträchtigt.

### STRESZCZENIE

Obiektem badań był wymoczek *Spirostomum ambiguum*, odznaczający się zdolnością do reagowania skurczem na działanie różnych bodźców. W doświadczeniach zastosowano metodę swobodnie spadającej kropli, pozwalającą na wywoływanie wstrząsów środowiska z siłą 400—4800 ergów. Częstotliwość bodźca wynosiła 5—20/min. Przy zastosowaniu innej metodyki przebadano również wpływ bodźca o sile 20000 ergów. We wszystkich przypadkach stwierdzono istotny wpływ siły i częstotliwości bodźca na przebieg zaniku kurczliwości. Niezależnie od obu tych czynników obserwuje się zanik kurczliwości w miarę postępu czasu drażnienia. Stopniowy zanik skurczów uznano za przywykanie do rytmicznie działającego bodźca mechanicznego. O ile przy bodźcach słabych o określonej ich częstotliwości wpływ znużenia jest całkiem nieistotny, to przy bodźcach silnych i przy dużej ich częstotliwości znużenie wysuwa się na plan pierwszy, prowadzi do objawów patologicznych i wpływa w sposób istotny na przebieg zjawiska.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Alverdes F. 1922a: Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. Arb. a.d. Gebiete d. exp. Biol. 3, 1—133.
- Alverdes F. 1922b: Zur Lehre von der Reaktionen der Organismen auf äussere Reize. Biol. Zentrbl. 42, 218—222.
- Alverdes F. 1923: Beobachtungen an *Paramecium putrinum* und *Spirostomum ambiguum*. Zool. Anz. 55, 277—287.
- Blättner H. 1926: Beiträge zur Reizphysiologie von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Arch. f. Protistenk. 53, 253—311.
- Bozler E. 1926: Reizphysiologische Untersuchungen an Paramecien. Zool. Anz. 2, 124—129.
- Browne K. M. R. 1938: The Golgi—apparatus and other cytoplasmatic bodies in *Spirostomum ambiguum*. Royal micr. Soc. Ser. III. 58, 188—199.
- Czerniewski Z. 1930: *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. — biologische Studien Teil I. Trav. Labor. Biol. Gen. Inst. Nencki. 6, 151—166.
- Czerniewski Z. 1935: Działanie niektórych środków nasennych i alkaloidów na *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Acta Biol. Exp. 9, 91—110.
- Danisch F. 1921: Über die Reizbiologie und Reizempfindlichkeit von *Vorticella nebulifera*. Zeitschr. allg. Physiol. 19, 133—190.
- Folger H. T. 1926: The effects of mechanical shock on locomotion in *Amoeba proteus*. J. Morphol. Physiol. 42, 359—370.
- Fortner H. 1926: Zur Morphologie und Physiologie des Vorticellenstieles. Zeitschr. Wiss. Zool. 128, 114—132.
- Gelei J. 1929: Über das Nervensystem der Protozoen. Allattani Közlemenyek. 26, 164—190.
- Grębecki A.: 1963: Galvanotaxie transversale et oblique chez les Ciliés. Acta Protozool. 1, 91—98.
- Grębecki and Kuźnicki L. 1956: Autoprotection in *Paramecium caudatum* by Influencing the Chemical Properties of its Medium. Acta Biol. Exp. 17, 71—107.
- Hempelmann F. 1926: Tierpsychologie vom Standpunkte des Biologen. Leipzig. Akadem. Verl. Ges.
- Jenkin P. 1927: The Relation of *Spirostomum ambiguum* to the hydrogen ion concentration (alkaline range). Brit. J. Exp. Biol. 4, 365—377.
- Jennings H. S. 1899: Reactions to localized stimuli in *Spirostomum* and *Stentor*. Amer. Nat. 33, 372.
- Jennings H. S. 1906: Behavior of the Lower Organisms. New York.
- Joteyko J. 1932: Znużenie. Warszawa.
- Kinosita H. 1938: Electrical stimulation of *Paramecium* with two successive subliminal current pulses. J. Cell. Comp. Physiol. 12, 103—118.
- Klein B. 1932: Das Ciliensystem in seiner Bedeutung für Lokomotion, Koordination und Formbildung mit besonderer Berücksichtigung der Ciliaten. Ergebn. d. Biol. 8, 75.
- Kolzoff N. K. 1911: Untersuchungen über die Kontraktilität des Stieles von *Zoothamnium alternans*. Biol. Zeitschr. Moskau. 2, 137.
- Lagrange F. et Grandmaison F. 1912: La Fatigue et le Repos. Paris. Alcan.
- Missiuro W. 1947: Znużenie. Warszawa. Książka.
- Müller H. K. 1926: Die Latenzzeit kontraktiler Infusorien bei Reizung mit Einzelinduktionsschlag. Zeitschr. Biol. 85, 31—44.
- Neresheimer E. R. 1903: Über die Höhe der histologischen Differenzierung bei heterotrichen Ciliaten. Arch. f. Protistenk. 2, 305.
- Pastori G. 1932a: Ricerche sull' eccitabilità delle vorticelle. Arch. Sci. Biol. (Naples). 17, 145—163.
- Pastori G. 1932b: Variazioni del pH nei vacuoli delle vorticelle in seguito a contrazioni provocate. Arch. Sci. Biol. (Naples). 17, 164—168.
- Plavilstchikov N. N. 1928: Observations sur l'excitabilité des infusoires. Ruskiy Archiv Protistologii. 7, 1—24.
- Pütter A. 1904: Die Reizbeantwortung der ciliaten Infusorien. Zeitschr. allg. Physiol. 3, 406—454.

- Raabe Z. 1954: Pierwotniak — Komórka — Organizm. Materiały Konferencji Młodej Kadry Biologów w Kortowie. Warszawa P.W.R.iL.
- Rees Ch. W. 1922: The neuromotor apparatus of *Paramecium*. Univ. Calif. Publ. Zool. 20, 333—364.
- Saunders J. T. 1924: The effect of hydrogen ion concentration on the behavior, growth and occurrence of *Spirostomum*. Proc. Cambr. Phil. Soc. 1, 189—203.
- Skrochowska R. 1938: Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize. Extr. du Bull. de l'Acad. Pol. d. Sciences et d. Letters. Serie B. Kraków. 89—107.
- Specht H. 1934: Aerobic respiration in *Spirostomum ambiguum* and the production of ammonia. J. Cell. Comp. Physiol. 5, 319—333.
- Specht H. 1935: The culture of *Spirostomum ambiguum*. Arch. f. Protistenk. 85, 150—152.
- Wawrzyńczyk S. 1937: Badania nad pamięcią *Spirostomum ambiguum major*. Acta. Biol. Exp. 9, 67—77.
- Weizsäcker V. 1926: Einleitung zur Physiologie der Sinne. Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. 2.
- Yocom H. B. 1918: The neuromotor apparatus of *Euplotes patella*. Univ. Calif. Publ. Zool. 18, 337—396.



Abteilung für Allgemeine Biologie des M. Nencki Institutes für Experimentelle Biologie,  
Polnische Akademie der Wissenschaften, Warszawa 22, Pasteura 3

Włodzimierz KINASTOWSKI

## Das Problem „des Lernens“ bei *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Zagadnienie „uczenia się” u *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Das Problem „des Lernens“ bei *Spirostomum*, dh. der Deutung des Aufhörens der Kontraktionen auf rhythmisch sich wiederholende schwache Reize knüpft überhaupt an das Problem „des Lernens“ bei Protisten an.

Die Literatur des Problems durchschauend sind wir auf Grund der gebrauchten Nomenklatur und Untersuchungsmethoden — gezwungen das ganze Problem in einer arbiträrer Einteilung vorzustellen. Das Problem „des Lernens“ bei den Protisten versuche man tatsächlich durchzuforschen als: a) das Lernen durch Gewöhnung an die wirkende Reize b) das Lernen durch Proben und Fehler c) das Lernen durch die Erwerbung von bedingten Reflexen.

Die erste Gruppe eröffnen die klassische Untersuchungen von Jennings 1899, 1906, über *Amoeba*, *Stentor*, *Epistylis*, *Carchesium* und *Spirostomum*. An diese Arbeiten knüpfen eng die Untersuchungen von Neresheimer 1903, Pütter 1904, Blättner 1926, Kolzoff 1921, Danisch 1921, Fortner 1926, Pastori 1932, Plavilstchikov 1928, Skrochowska 1938, Wawrzyńczyk 1937 usw. über andere Protisten, so wie auch zahlreiche Arbeiten von Mast 1924, 1926, 1927 a, b, c, 1932, 1937, usw. an. Alle diese Autoren stellten eine gewisse Gewöhnung der untersuchten Protisten an die wirkende Reize — hauptsächlich — mechanische fest und nehmen — mehr oder weniger deutlich — diese Gewöhnung als eine der Stufen des primitiven Lernens an, was eine Krönung bei Wawrzyńczyk 1937 fand, welcher diese Erscheinung in der Kategorien „des Lernens“, „des Gedächtnisses“ und der „Vergesslichkeit“ betrachtet hatte.

In einigen Versuchen konnte man nicht nur das Aufhören der Reaktionen — eine Gewöhnung — erzielen, sondern die Tiere konnten denselben Reiz ganz anders beantworten, wie z.B. *Stentor*, *Amoeba*, *Vorticella* (Jennings 1906), was kann aber schon in die Kategorie des Lernens durch Proben und Fehler berechnet werden.

Im Ganzen und Grossen handelte es sich um das, dass manche Protisten weisen — in geeigneten Verhältnissen — eine gewisse Eigenschaft auf, seine angeborene Reaktionen auf biologisch unschädliche, gleichgültige, schwache Reize allmählich einstellen zu vermögen, an diese Reize sich gewöhnen, was letzters auch von uns (Kinastowski 1963) untersucht wurde.

Zu der zweiten Gruppe gehören vor allem die Arbeiten von Smith 1908,

Day and Bentley 1911 und Buytendijk 1919, welche die Umdrehungsversuche von *Paramecium* in der Glaskapillaren betrachteten, dann von French 1940 über das Herausschwimmen der Paramecien aus der Glaskapillaren, und einige Arbeiten von Mast (besonders von Mast and Pusch 1924, oder Mast and Stahler 1937) über das Verhalten der Amöben gegen die Lichtreize. Aus allen diesen und ähnlichen Versuchen geht hervor, dass die untersuchten Protisten konnten einige Reaktionen auslernen oder waren im Stande, ihre ursprüngliche Reaktionen durch Proben und Fehler verbessern event. auf andere zu ändern.

Die zahlreichste ist aber die dritte Gruppe der Untersuchungen über das Lernvermögen der Protisten. Mehrere Autoren haben sich hier in ihrer Arbeiten bemüht zu beweisen, dass den Protisten auch ein Vermögen der Herausbildung von bedingten Reflexen innewohnt, dass sie auch auf Grund einer bedingten Reaktion, analogischen mit dem bedingten Reflex bei den Tieren mit dem Nervensystem, lernen können. Auch die Methodik dieser Arbeiten wurde hier auf die klassische Methode der Erwerbung von bedingten Reflexen zurückgeführt.

Eine der ersten Proben bei den Protisten einen bedingten Reflex zu erzielen, waren die Arbeiten von Metalnikow 1907, 1914, 1917 über die Nahrungswahl und über das Bedingen dieser Wahl mit Rotlicht und Alkohol. Weitere Arbeiten über die Nahrungswahl, wie die von Wladymirski 1916 und besonders Dembowski 1921a, 1921b, 1921c, haben einige methodische Fehler in den Untersuchungen von Metalnikow festgestellt, obwohl Dembowski neigte sich zu, einen Einfluss der zuverigen Erfahrung auf die Steigerung der Wahlfähigkeiten nicht gänzlich auszuschliessen. Auch weitere Arbeiten über dieses Problem, wie z.B. von Lozina-Lozinski 1931, Bragg 1939, Grittner 1951 u.a. haben die Erzielung der bedingten Reflexe nicht bestätigt, obwohl wiesen deutlich auf eine Steigerung der Wahlfähigkeiten mit dem Zeitverlauf auf, was scheint vielmehr diese Arbeiten zu den Versuchen des Lernens durch Proben und Fehler einzureihen. Mehr entschlossene Probe einen bedingten Reflex bei *Paramecium* und *Stylonychia* zu erzeugen, hat Bramstedt 1935a, 1935b, 1936, 1939 unternommen. Als entsprechende bedingte und unbedingte Reize wurden das Licht, die Dunkelheit, die Wärme, die Erschütterung usw. angewandt. Die Schlussfolgerungen waren, dass die untersuchten Infusorien haben entsprechende bedingte Reflexe erworben und sie ca durch 15 Min. beibehalten konnten.

Die ganze Frage hatte mehrere Untersuchungen angeregt (z.B. Alverdes 1922 — 1943), welche sie entweder kritisch, wie z.B. Grabowski 1939, oder positiv, wie z.B. — Diebschlag 1940, betrachtet haben, um endlich nach heftigen Diskussion — Koehler, Bramstedt, Alverdes 1939 — unentschieden zu lassen. Letztens Best 1954 konnte feststellen, dass die photophobische Erscheinungen bei *Paramecium* können auch ohne Licht hervorgeufen werden. Der thermische Schock bewirkt schon selbst eine kurze Lichtempfindlichkeit, was deutlich gegen die Erwerbung der bedingten Reflexe zu sprechen scheint.

Eine andere Gruppe der Forscher hat sich wieder mit dem elektrischen Strom als dem unbedingten Reiz bedient. Soest 1937 und dann Wawrzyńczyk 1938 behaupteten auf Grund der durchgeführten Dressur, dass manche Infusorien, wie z.B. *Paramecium*, *Stylonychia*, *Spirostomum* u.a., können nicht

nur die Reize analogisch wie höher stehende Tiere verbinden, aber vermögen auch, wie das Wa r z y ń c z y k angibt, das farbige Licht unterscheiden zu lernen und die erworbene bedingte Reflexe zu hemmen. Die Arbeiten von Dem b o w s k i 1950 auf *Paramecium* und Da b r o w s k a 1956 auf *Paramecium*, *Stentor* und *Spirostomum*, haben diese Ergebnisse und ihre Deutung nicht bestätigt und einige Veränderungen in dem Verhalten der untersuchten Protisten vielmehr als das Ergebnis der chemischen Faktoren, welche während der Stromwirkung im Milieus entstehen konnten angenommen.

Eine besondere Erwähnung verdienen hier enige Arbeiten von Gelber 1952, 1956a, b, c, 1958 die den Reiz (Erschütterung) mit der Nahrung (Bakterien) verstärkte und in dieser Weise eine positive Dressur der Paramecien auf spätere blosser Erschütterung des Wassers erlangte. Doch wurden auch diese Experimente schon kritisch von J e n s e n 1957 betrachtet.

Herrn Prof. Dr. Jan Dembowski bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und Seinen wertvollen Rat bei der Ausführung derselben zu grossem Dank verpflichtet.

#### Das normale Verhalten und die Gewöhnung an die wirkende Reize

*Spirostomum ambiguum* züchten sich gut auf schwachen Dekokten aus dem getrockneten Heu oder Kopfsalatblätter bei pH 7—8 und in der Zimmertemperatur. Die wirkende Reize (chemische, mechanische, elektrische) beantworten sie mit den Zückungen des ganzen Körpers. Wenn die Reize nicht zu stark sind und mit nicht zu grosser Frequenz einwirken, dann hören die Protisten mit ihrer Kontraktionen allmählich auf und gewöhnen an den rhythmisch sich wiederholenden, mechanischen, biologisch unschädlichen Reiz. Wie wir es schon früher feststellen konnten (K i n a s t o w s k i 1963), die volle Gewöhnung, das völlige Aufhören der Kontraktionen findet bei der Reizstärke 1600 erg und Reizfrequenz 10/Min. nach ca 13—15 Min. statt. Wenn wir die Frequenz steigern oder die Reizstärke vergrössern (event. beide Faktoren zusammen) dann beginnt immer wesentlichste Rolle die Ermüdung zu spielen, welche in den extremen Fällen zu den pathologischen, unumkehrbaren Erscheinungen und endlich zum Tode führen kann. Wir haben uns bemüht in allen hier vorliegenden Versuchen solche Zustände, welche den eigentlichen Verlauf der Erscheinung sehr täuschen können, möglichst völlig zu vermeiden. In allen Versuchen haben wir deshalb die schon früher erprobte Methode des frei abfallenden Tropfens, welche verschieden starke Erschütterung des Milieus verursachte, angewandt.

#### Der Einfluss der Pausendauer auf die Kontraktilität

Die untersuchten Individuen hat man bis zum völligen Aufhören der Kontraktionen (ca 15—20 Min.) gereizt. Die Reizstärke betrug 1600 erg, die Reizfrequenz 10/Min. Nach dem völligen Erlöschen der Kontraktionen wurden verschiedene Pausen (von 1 bis 30 Min.) in der Reizung angewandt, dann wurden die Tiere weiter gereizt. Weil die erste Reizungsperiode wurde schon früher (K i n a s t o w s k i 1963) eingehender untersucht, dann in diesen Versuchen hat man nur die zweite Reizungsperiode, nach den entsprechenden Pausen beobachtet, verglichen und statistisch auf vergleichbarem Niveau analysiert.

Das Erlöschen der Kontraktionen in der zweiten Reizungsperiode verläuft unabhängig von der Pausendauer. Doch das völlige Aufhören der Kontraktionen hängt ganz deutlich von der Pausendauer, dh. je länger die Pause in der Reizung dauert, desto quantitativ grösser ist das Zurückkehren der zuverigen Kontraktilität.

Tabelle 1

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen bei der Anwendung von 1 bis 30 Min. Reizungspausen (in %)

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen vor der Pausen (Vergleichbar)	Zeit in Min.	Pausendauer						
		1 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	20 Min.	25 Min.	30 Min.
80	1	28	28	48	50	62	72	90
62	2	14	20	30	36	40	54	62
56	3	14	16	18	26	24	32	44
36	4	6	10	16	12	18	24	30
22	5	6	4	10	6	10	20	32
18	6	—	—	4	6	6	10	18
10	7	—	—	4	2	6	8	14
8	8	—	—	—	—	—	6	8
8	9	—	—	—	—	—	6	8
6	10	—	—	—	—	—	6	6
Die mittlere Zahlen der Kontraktionen für die erste 5 Min.		$x_1 =$ 13.6	$x_2 =$ 15.6	$x_3 =$ 24.4	$x_4 =$ 26.0	$x_5 =$ 30.8	$x_6 =$ 41.8	$x_7 =$ 51.6

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen bei den angewandten Pausen, statistisch nur für die erste 5 Minuten der zweiten Reizung analysiert, beginnen wesentlich von der 10 minutiger Pause sein. Bei der Anwendung längeren Pausen reagieren die Protisten auf die zweite Reizung so, dass die Zahlen der Kontraktionen nähern sich immer mehr zu den Zahlen, mit welchen haben sie die zuverige Reizung beantwortet.

Weil in allen diesen Versuchen wiesen die Protisten physiologisch normale Leistungsfähigkeit auf und auch alle qualitativ andere Reize sofort beantworten können, müssen wir feststellen, dass ihr Verhalten nach der Pause hängt einigermassen von der zuverigen Reizung. Die Zahl der Kontraktionen nach der Pause ist kleiner als bevor und das völlige Erlöschen findet im Grunde schneller statt (ausser der 25 und 30 Min. Pausen). Das zwingt uns zur Annahme, dass auf das Verhalten der Tiere übt die vorherige Erfahrung, die vorherige Gewöhnung an den wirkenden Reiz, einen wesentlichen Einfluss aus. Der Einfluss dieser Erfahrung auf die Reaktionen der Tiere nach der angewandten Pausen hält ungefähr 30 Minuten an. Bei solchen und längeren Pausen in der Reizung kann man den Einfluss der Erfahrung

nicht mehr feststellen. Die Zahl der Kontraktionen beginnt wieder grösser, dh. fast dieselbe, wie in der ersten Versuchen, sein und auch das völlige Aufhören der Kontraktionen findet fast in derselben Zeit statt.

Tabelle 2

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen nach der entsprechenden Pausen (in %)

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen		$x_7$ 51,6	$x_6$ 41,8	$x_5$ 30,8	$x_4$ 26,0	$x_3$ 24,4	$x_2$ 15,6	$x_1$ 13,6
Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen	$x_7$	0	9.8	20.8	25.6	27.2	36.0	38.0
	$x_6$	—	0	11.0	15.8	17.6	28.2	30.2
	$x_5$	—	—	0	4.8	6.6	17.2	19.2
	$x_4$	—	—	—	0	1.8	12.4	14.4
	$x_3$	—	—	—	—	0	10.6	12.6
	$x_2$	—	—	—	—	—	0	2.0

$P = 0.95$ ;  $m_r \cdot t_{0,05} = 5.3\%$

$P = 0.99$ ;  $m_r \cdot t_{0,01} = 6.8\%$

Die durchgeführte Versuche wiesen auf, dass die Gewöhnung an den wirkenden Reiz steigert sich noch bei der Anwendung von kurzen Reizungspausen (bis 10 Min.), was sich dadurch ausdrückte, das bei der wiederholten Reizung konnte man schneller das völlige Aufhören der Kontraktionen erreichen. Wenn man die Pausen in der Reizung verlängert, dann löscht die erreichte Gewöhnung allmählich aus und hört bei den längeren als 30 Min. Pausen völlig auf.

#### Der Einfluss der mehrmaligen Pausen in der Reizung auf die Kontraktibilität

Um näher an die Frage des event. Einflusses der zuverigen Erfahrung der untersuchten Protisten zu kommen, wurden mehrmalige Pausen (10 und 30 Min.) in der Reizung angewandt. Bei der 10 Min. Pause in der Reizung wiesen die Protisten so das schnellere Aufhören der Kontraktionen, wie auch kleinere Zahl derselben bei der wiederholten Reizung auf. Bei der Anwendung der 30 Min. Pause konnte man dagegen fast keine Veränderungen in dem Verhalten der Tiere beobachten. So die Zeit des Erlöschens der Kontraktionen, wie auch die Zahl derselben waren vor und nach der Pause fast dieselbe.

In den unten angegebenen Versuchen hat man einzelne Individuen bis zum völligen Aufhören der Kontraktionen gereizt (R-stärke 1600 erg, R-fre-

quenz 10/Min.), dann entsprechende Pause angewandt, dann wieder gereizt, wieder Pause usw. Es wurden fünf solche Reizungsperioden durch entsprechenden Pausen geteilt berücksichtigt: die erste Einleitungsperiode (I) und weitere Reizungsperioden (II, III, IV, V) nach entsprechenden Pausen. Weil die Reaktionen der Tiere bei der beiden Pausen verschieden in der Zeit waren (je kürzer die Pause, desto schnellerer Kontraktionsschwund), hat man sie bei der Bearbeitung der Ergebnisse besonders betrachtet.

Tabelle 3

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen in der aufeinander folgenden Reizungsperioden nach der 30 Min. Pausen (in %)

Zeit in Min.	Die aufeinander folgende Reizungsperioden					$\Sigma$
	I	II	III	IV	V	
1	82	76	82	78	86	404
2	45	60	64	62	58	298
3	48	52	42	44	48	234
4	40	38	32	36	38	184
5	22	24	20	22	28	116
6	16	18	16	24	24	98
7	16	14	10	16	18	74
8	24	6	6	6	14	56
9	16	14	14	6	12	62
10	10	2	6	8	4	30
11	2	4	10	2	6	24
12	2	2	6	2	2	14
13	2	2	4	2	2	12
$\Sigma$	334	312	312	308	340	1606

a. Der Einfluss der mehrmaligen 30 Min. Pause.

Aus der Tabelle, so wie auch aus der statistischen Analyse geht deutlich hervor, dass die mehrmalige Anwendung von 30 Min. Reizungspausen übt keinen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der untersuchten Protisten aus. Die Zahl der Kontraktionen in den entsprechenden Minuten des Experimentes für jede Reizungsperiode, so wie auch die Summen derselben für die ganze Untersuchungszeit vor und nach den Pausen bleiben fast dieselbe. Auch das völlige Aufhören der Kontraktionen findet in jeder Reizungsperiode fast in derselben Zeit statt. Die Protisten reagieren nach jedermaliger Pause so wie am Anfang des Experimentes.

b. Der Einfluss der mehrmaligen 10 Min. Pause.

Die erste Minuten der Reizwirkung in der Einleitungsperiode (I) und nach der aufeinander folgenden Pausen weisen grosse Differenzen in der Zahl der Kontraktionen auf, welche sich dagegen in der weiteren Minuten fast gänzlich verwischen. Ganz anders stellt sich auch das Verhalten der Tiere mit dem Zeitverlauf vor. Wenn bei der 30 Min. Pausen das völlige Aufhören der Kontraktionen war fast dasselbe (in der Zeit), wie in der Einleitungs-

periode, so jetzt beobachten wir diese Erscheinung schon ungefähr um die achte Minute des Experimentes. Die Zahl der Pausen übt hier jedoch keinen Einfluss auf die Verkürzung der Zeit des völligen Erlöschens der Kontraktionen aus. Die Zahl der Kontraktionen in der ersten drei — vier Minuten des Experimentes ist nach der ersten Pause (II Periode) deutlich grösser als die Zahl derselben nach den weiteren Pausen, was auch die statistische Analyse bestätigte. Um die sechste (und weitere) Minuten des Experimentes die Zahl der Kontraktionen nach jeder Pause ist relativ kleiner, obwohl die Unterschiede schon keinen wesentlichen Charakter aufweisen.

Tabelle 4

Die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen in der aufeinander folgenden Reizungsperioden nach der 10 Min. Pausen (in %)

Zeit in Min.	Die aufeinander folgende Reizungsperioden					Σ
	I	II	III	IV	V	
1	78	44	32	23	28	208
2	54	18	22	20	20	144
3	42	26	14	16	12	112
4	34	14	14	10	6	78
5	20	12	12	8	10	62
6	18	8	4	4	4	38
7	10	8	2	2	2	24
Σ	256	144	96	88	82	666
Die mittlere Zahlen der Kontraktionen	$x_1=36.6$	$x_2=20.6$	$x_3=13.7$	$x_4=12.6$	$x_5=11.7$	

Wenn wir die mittlere Zahlen der Kontraktionen aus den ersten sieben Minuten für jede Reizungsperiode vergleichen, dann können wir ihre gewisse Verminderung in der aufeinander folgenden Perioden feststellen. Dasselbe stellen wir für alle aufeinander folgende Periode im Vergleich zu der II Reizungsperiode fest. Zwischen den letzten Reizungsperioden (III, IV, V) kann man schon aber keine wesentliche Unterschiede aufweisen.

Im Ganzen kann man behaupten, dass bei der mehrmaligen Anwendung von 10 Min. Pausen, schon nach der ersten Pause (II Reizungsperiode) beobachten wir einen wesentlichen Schwund der Zahl der Kontraktionen, welcher vergrößert sich noch nach der zweiten Pause. Doch die weitere Pausen üben schon keinen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der Tiere aus. Die zuvorige Erfahrung des Tieres kommt also zum Ausdruck nach der ersten, und sogar noch nach der zweiten 10 Min. Pause; weitere Pausen haben keinen sichtbaren Einfluss auf die Ergebnisse.

Tabelle 5

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen für entsprechende Reizungsperioden (in %)

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen		$x_1$ 36,6	$x_2$ 20,6	$x_3$ 13,7	$x_4$ 12,6	$x_5$ 11,7
Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen	$x_1$	0	16,0	22,9	24,0	24,9
	$x_2$	—	0	6,9	8,0	8,9
	$x_3$	—	—	0	8,0	8,9
	$x_4$	—	—	—	0	0,9

$$P = 0,95; m_r \cdot t_{0,05} = 3,8\%$$

$$P = 0,99; m_r \cdot t_{0,01} = 4,9\%$$

Wen wir jetzt den Einfluss der mehrmaligen Anwendung der 30 Min. und 10 Min. Pausen vergleichen wollen, dann können wir feststellen, dass bei den 30 Min. Pausen lassen sich keine wesentliche Abweichungen von den Reaktionen der Tiere in der Einleitungsperiode nachzuweisen. Nach den ersten zwei 10 Min. Pausen haben wir doch mit einer Erscheinung zu tun, welche — bei der Berücksichtigung und Beibehaltung aller normalen Versuchsbedingungen — als ein Einfluss der zuverigen Erfahrung des Tieres zu deuten ist.

#### Der Einfluss der zuverigen langdauernden Reizung auf das Kontraktionsvermögen

In den hier angeführten Versuchen hat man einzelne Individuen entsprechend lange Zeit gereizt (R-stärke 1600 erg, R-frequenz 10/Min.), dann eine 10 Min. Pause angewandt und wieder die Tiere gereizt. Das völlige Aufhören der Kontraktionen bei der Reizung nach der Pause fand in der 8—12 Min. des Experimentes statt, doch statistisch wurden nur die erste sechs Minuten der zweiten Reizungsperiode berücksichtigt.

Das ganze Verhalten der Protisten nach der zuverigen Reizung und darauf folgender Pause weist ziemlich deutlich charakteristische drei Phasen auf. Die erste (1—3 Min.) kennzeichnete sich mit einer gewaltigen Verminderung der Kontraktionen und um so kleinere Zahl derselben, je länger die Einleitungsreizung dauerte. In der zweiten Phase (4—6 Min.) scheinen die Kontraktionszahlen schon nicht so wesentlich in der Abhängigkeit von der Zeit der zuverigen Reizung zu bleiben und in der dritten Phase (bis zum völligen Erlöschen) scheinen diese Unterschiede ganz zufälligen Charakter zu tragen.

Wenn vergleichen wir die durchschnittliche Zahl der Kontraktionen in der zweiten Periode der Reizung für alle angewandte Einleitungsreize, dann stellen wir einen wesentlichen Schwund derselben — im Vergleich zu der 30 Min. Einleitungsreizung — nur für die letzte drei Einleitungsreizungsperioden (90, 105 und 120 Min.).



Tabelle 6

Die durchschnittliche Zahlen der Kontraktionen in der zweiten Reizungsperiode nach der entsprechenden Einleitungsreizung (in%)

Zeit der Einleitungsreizung in Min.	Die aufeinander folgende Minuten der zweiten Reizungsperiode							Die mittlere Zahlen der Kontraktionen	Die mittlere Zahlen der Kontraktionen für die erste 3 Min. gerechnet
	1	2	3	4	5	6	$\Sigma$		
30	50	28	14	12	6	6	116	$x_1 = 19.3$	$x_1 = 30.7$
45	46	22	12	8	6	2	96	$x_2 = 16.0$	$x_2 = 26.7$
60	46	20	14	4	8	8	100	$x_3 = 16.7$	$x_3 = 26.7$
75	42	22	12	12	4	6	98	$x_4 = 16.3$	$x_4 = 25.3$
90	36	14	10	8	12	6	86	$x_5 = 14.3$	$x_5 = 20.0$
105	28	14	16	8	6	8	80	$x_6 = 13.7$	$x_6 = 19.3$
120	34	18	8	10	12	8	90	$x_7 = 15.0$	$x_7 = 18.0$
$\Sigma$	282	138	86	62	54	44	666		

$$P = 0.95; m_r \cdot t_{0.05} = 3.4\%$$

$$P = 0.99; m_r \cdot t_{0.01} = 4.4\%$$

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, dass wir nicht ganz entscheidend behaupten können, dass die längere Einleitungsreizperiode einen wesentlichen Einfluss auf die Verminderung der Kontraktionszahl mit dem Zeitverlauf des Experimentes ausübte. Doch wenn wir die erste Phase der nachfolgenden Reizung (die erste 3 Min.) eingehender betrachten, dann können wir einige interessante Tatsachen feststellen.

Diese Angaben wiesen deutlich auf, dass der Einfluss der zuverigen Reizung (die Dauer der Einleitungsreizperiode) drückt sich ganz wesentlich nur in der ersten Phase (erste 3 Min.) des Experimentes aus. Je länger war die Einleitungsreizung, desto kleiner war die Zahl der Kontraktionen nach der 10 Min. Pause in der zweiten Reizungsperiode. In der weiteren Phasen der zweiten Reizung können wir aber schon keinen wesentlichen Einfluss der Dauer der zuverigen Reizung feststellen.

Der Einfluss der zuverigen Erfahrung der Protisten kommt also in der o.e. Verhältnissen nur in den ersten drei Minuten des Versuches zum Stande. In allen Fällen waren die untersuchten Protisten ständig ganz leistungsfähig und beantworteten sofort mit Kontraktionen alle qualitativ andere Reize.

Tabelle 7

Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen der Kontraktionen für die erste drei Minuten der zweiten Reizungsperiode gerechnet (in%)

Die mittlere Zahlen der Kontraktionen		$x_1$ 30.7	$x_2$ 26.7	$x_3$ 26.7	$x_4$ 25.3	$x_5$ 20.0	$x_6$ 19.3	$x_7$ 18.0
Die Differenzen zwischen den mittleren Zahlen	$x_1$	0	4.0	4.0	5.4	10.7	11.4	12.7
	$x_2$	—	0	0	1.4	6.7	7.4	8.7
	$x_3$	—	—	0	1.4	6.7	7.4	8.7
	$x_4$	—	—	—	0	5.3	6.0	7.3
	$x_5$	—	—	—	—	0	0.7	2.0
	$x_6$	—	—	—	—	—	0	1.3

$P = 0.95$ ;  $m_r \cdot t_{0,05} = 4.7\%$

$P = 0.99$ ;  $m_r \cdot t_{0,01} = 6.1\%$

### Diskussion

Die von uns früher (Kinastowski 1963), wie auch jetzt durchgeführte Versuche, so wie auch die Angaben von anderen Autoren, scheinen unumstrittbar einige Tatsachen festzustellen. *Spirostomum ambiguum*, so wie auch andere kontraktionsfähige Protisten, reagieren an die sich rhythmisch wiederholende, biologisch unschädliche, also für sie gleichgültige Reize, allmählich immer seltener, und endlich auf sie überhaupt zu beantworten. Wenn wir den wesentlichen Einfluss von Nebenfaktoren und vor allem der Ermüdung — welche doch jede ausgeführte Arbeit in irgenwelcher Weise begleiten muss — möglichst völlig ausschliessen zu vermögen sind, dann haben wir vor uns einen rein adaptativen physiologischen Process. Dieser Process scheint eine allgemeine Gültigkeit in der ganzen Lebewelt zu haben, und kann als die Gewöhnung an den wirkenden Reiz betrachtet werden.

Wir müssen uns hier — so wie bei der Besprechung fast des ganzen Problems — mit einem vielmehr psychologischen Begriff zu befriedigen, weil wir noch nicht im Stande sind, solche und ähnliche Prozesse in rein physiologischen Begriffen exact zu beschreiben. Wir vermuten auch, dass (u.a.) aus diesem Grunde hat sich das ganze Problem mehr in die psychologische, als in die physiologische Richtung verschoben, was manchmal zu sehr groben Analogien sogar Anthropomorphismen und zu theoretischen Erwägungen führen konnte. So ist z.B. bei Wawrzyńczyk 1937, welcher behauptete (seine Arbeiten mit den Versuchen von Krechewsky und Honzik 1932 oder Tolman 1934 über die höhere Tiere, wie auch von Ebbinghaus

1919 über die Menschen vergleichend), dass „das Verhalten von *Spirostomum* unterscheidet sich fast überhaupt nicht von dem Verhalten der anderen Tiere in den allgemeinen Fällen des Lernens und Vergesslichkeit“ — oder weiter — dass“ das Verhalten von *Spirostomum*... findet eine Analogie mit dem Prozess des schnellen event. langsamen Lernens bei den Menschen, Affen und Ratten“ (S. 75).

Wir möchten nur an dieser Stelle anmerken, dass obwohl alle Analogien einen grossen heuristischen Wert darstellen können, doch aber keine Beweiskraft besitzen.

In unseren Versuchen konnten wir nur feststellen, dass die Gewöhnung von *Spirostomum* an die schwache mechanische Reize (R-stärke 1600 erg, R-frequenz 10/Min.) findet ca um die 13—15 Min. statt, dass sie ca 30 Min. dauert und, dass die Anwendung von kurzen mehrmaligen Pausen in der Reizung (ca 10 Min.), so wie auch einer 10 Min. Pause nach langdauernder Reizung (90—120 Min.), dieses Anpassungsvermögen bischen aber wesentlich verbessern können. Weil wir den Einfluss von Nebenfaktoren und Ermüdung fast — in diesen Verhältnissen — als ausgeschlossen halten, dann sind wir gezwungen in dieser Anpassungserscheinung den wesentlichen Einfluss von der unmittelbaren, zuvorigen Erfahrung des Tieres zu sehen. Wir deuten das so, dass das Aufhören der Kontraktionen scheint solche biologische Begründung finden, dass diese einzellige Tiere lassen sich nicht in den normalen, physiologischen, lebenswichtigen Funktionen mit den unschädlichen, für sie also biologisch gleichgültigen Reizen stören — sie hören ganz einfach auf sie zu beantworten. Von anderer Seite aber, was bestätigen die Kontrollversuche, die untersuchten Protisten vermögen doch die Reize zu empfangen obwohl ihre Reaktionen gehemmt wurden, was scheint wieder für einen zentralen und nicht adaptativen Process zu sprechen. Wenn es sich hier um eine gewöhnliche Adaptation handeln sollte, dann könnten wir eine Verminderung der Receptorenempfindlichkeit (d.h. des ganzen Infusor) erwarten, was in Wirklichkeit nicht der Fall ist. Doch bei den Tieren mit dem vielmehr hypothetischen Nervensystem scheint uns die Frage schwer zu errötern.

H e m p e l m a n n 1926 u.a. Autorem meinen, dass wenn *Stentor* oder *Spirostomum* die gleichgültige Reize beantworten aufzuhören, also an sie gewöhnen, dann können wir hier über ein primitives Gedächtnis sprechen. K a f k a 1914, 1922 behauptete doch, dass in solchem Falle unentbehrlich ist — um diesen Begriff zu benutzen — dass das Tier den Reiz „erkennt“ dass er unschädlich ist und ihn mit den nächsten „identifiziert“. C a s o n 1937 meinte dagegen, dass man hier alle psychische Korellate an der Seite lassen muss, und aus seiner Definition des Lernens herausgehend behauptet, dass der Lernprozess kann auch ganz automatisch verlaufen, also auch dann, wenn das Tier so des Reizes, wie auch der Reaktion „nicht bewusst ist“.

Das Aufhören mit den Kontraktionen die für den Organismus biologisch gleichgültige Reize zu beantworten, kann vielmehr als eine physiologische Erscheinung betrachtet werden. Wir müssen deshalb die physiologische Begriffe dort wo möglich vermeiden. Wir haben vor uns einen biologisch allgemeinen physiologischen Prozess, welcher höchstwahrscheinlich nur eine der allgemeinen Grundlagen des eigentlichen Lernprozesses sein kann.

## Zusammenfassung

In der früheren Arbeit (Kinastowski 1963) festgestellte Gewöhnung der *Spirostoma* (in 13—15 Min.) an die schwache (1600 erg), rhythmisch (10/Min.) sich wiederholende, mechanische Reize, wurde hier um die Frage ihrer Verstärkung und des Einflusses der zuverigen Erfahrung der Protisten auf ihr späteres Verhalten ergänzt. Es wurden verschiedene Pausen (1—30 Min.) in der Reizung angewandt, welche wiesen auf einen Einfluss der unmittelbaren Erfahrung der Tiere noch nach einer 10—15 Min. Pause, und auf das völlige Erlöschen dieser nach einer längeren als 25—30 Min. Pause. Die mehrmalige Anwendung von 10 Min. und 30 Min. Pausen wies nur im ersten Falle einen wesentlichen Einfluss der zuverigen Reizung nach der ersten und zweiten Pause auf. Das Verhalten der Protisten nach verschieden lang dauernder Einleitungsreizperiode (30—120 Min.) und darauf folgender 10 Min. Pause, wies einen wesentlichen Einfluss dieser Einleitungsreizung nur in der ersten drei Minuten der zweiten Reizung auf.

Diskutiert wurde das Problem „des Lernens“ bei der Protisten.

## STRESZCZENIE

Po stwierdzeniu w badaniach poprzednich (Kinastowski 1963), że *Spirostomum ambiguum* przyzwyczajają się do słabych (1600 ergów), rytmicznie powtarzających się (10/min.) bodźców mechanicznych, zaprzestając w ciągu 13—15 minut reagować na nie skurczami ciała, podjęto próbę wzmocnienia tego przyzwyczajenia i przebadania wpływu uprzedniego doświadczenia zwierzęcia na jego zachowanie się. Zastosowano różne, jednorazowe przerwy (1—30 min.) w drażnieniu, dochodząc do wniosku, że wpływ uprzedniego doświadczenia zwierzęcia ujawnia się w sposób istotny w jego zachowaniu jeszcze po 10—15 minutowej przerwie, a wygasa zupełnie po przerwach dłuższych niż 25—30 minut. Zastosowanie kilkakrotnych przerw 10-cio i 30-to minutowych, wykazało jedynie w pierwszym przypadku wpływ uprzedniego drażnienia na zachowanie się pierwotniaków po pierwszej i drugiej przerwie. Reakcje pierwotniaków po uprzednim różnie długo trwającym (30—120 min.) drażnieniu i następnej 10 min. przerwie, wykazują jedynie w trzech pierwszych minutach drażnienia wtórnego pewną zależność od czasu drażnienia wstępnego.

Dyskutowane jest zagadnienie „uczenia się” u pierwotniaków.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Alverdes F. 1922: Zur Lehre von der Reaktionen der Organismen auf äussere Reize. Biol. Zentrbl. 42, 218—222.
- Alverdes F. 1923: Beobachtungen an *Paramecium putrinum* und *Spirostomum ambiguum*. Zool. Anz. 55, 277—287.
- Alverdes F. 1924: Über Reflexe, Instinkt- und Verstandestätigkeiten. Zool. Anz. 60.
- Alverdes F. 1937: Das Lernvermögen der einzelligen Tiere. Zeitschr. Tierpsych. 1, 35—38.
- Alverdes F. 1939: Zur Psychologie der niederen Tiere. Zeitschr. Tierpsych. 2, 258—264.
- Alverdes F. 1943: Die Marburger Untersuchungen über das Lernvermögen niederer Tiere. Forsch. u. Fortschr. 5/6, 60—62.

- Alverdes F., Bramstedt F., Koehler O. 1939: Zool. Anz. Suppl. 12.
- Best J. B. 1954: The photosensitization of *Paramecium aurelia* by temperature shock. A study of a reported conditioned response in unicellular organisms. J. Exp. Zool. 126, 87—99.
- Blättner H. 1926: Beiträge zur Reizphysiologie von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Arch. f. Protistenk. 53, 253.
- Bragg A. N. 1939: Selection of food by *Protozoa*. Turbox News. 17, 41—44.
- Bramstedt F. 1935: Dressurversuche mit *Paramecium caudatum* und *Stylonychia mytilus*. Zeitschr. vergl. Physiol. 22, 490—516.
- Bramstedt F. 1935: Die Lokalisation des chemischen und thermischen Sinnes bei *Paramecium*. Zool. Anz. 112, 257—262.
- Bramstedt F. 1936: Das Lernvermögen der Infusorien. Forsch. Fortschr. 12, 176.
- Bramstedt F. 1939: Über die Dressurfähigkeit der Ciliaten. Zool. Anz. Suppl. 12, 111—132.
- Buytendijk F. J. 1919: Acquisition d'habitudes par des êtres unicellulaires. Arch. neerl. Physiol. 3, 455—468.
- Cason H. 1937: The concepts of learning and memory. Psych. Rev. 44, 54—61.
- Danisch F. 1921: Über die Reizbiologie und Reizempfindlichkeit von *Vorticella nebulifera*. Zeitschr. allg. Physiol. 19, 133—190.
- Day L. M. and Bentley M. 1911: A note on learning in *Paramecium*. J. Anim. Behav. 1, 67—73.
- Dąbrowska J. 1956: Tresura *Paramecium caudatum*, *Stentor coeruleus*, *Spirostomum ambiguum* na bodźce świetlne. Folia Biol. 4, 77—91.
- Dembowski J. 1921a: O wyborze pokarmu i tak zwanych zjawiskach pamięciowych u *Paramecium caudatum*. Trav. Lab. Biol. Gen. Inst. Nencki 1, 1—37.
- Dembowski J. 1921b: Dalsze studia nad wyborem pokarmu u *Paramecium caudatum*. Trav. Lab. Biol. Gen. Inst. Nencki 1, 1—16.
- Dembowski J. 1921c: Wpływ koncentracji zawiesiny na liczbę utworzonych wodniczków pokarmowych u *Paramecium caudatum*. Trav. Lab. Biol. Gen. Inst. Nencki 1, 1—16.
- Dembowski J. 1950: On conditioned relations of *Paramecium caudatum* towards light. Acta Biol. Exp. 15, 5—18.
- Diebschlag E. 1940: Über die Lernfähigkeit von *Paramecium caudatum*. Zool. Anz. 130, 257—271.
- Ebbinghaus H. 1919: Grundzüge der Psychologie. Leipzig.
- Fortner H. 1926: Zur Morphologie und Physiologie des Vorticellenstieles. Zeitschr. Wiss. Zool. 128, 114—132.
- French J. W. 1940: Trial and error learning in *Paramecium*. J. Exp. Psychol. 26, 609—613.
- Gelber B. 1952: Investigations of the behavior of *Paramecium aurelia*: I. Modification of behavior after training with reinforcement. J. Comp. Physiol. Psychol. 45, 58—65.
- Gelber B. 1956a: Investigations of...: II. Modifications of a response in successive generations of both mating types. J. Comp. Physiol. Psychol. 49, 590—593.
- Gelber B. 1956b: Investigations of...: III. The effect of the presence and absence of light on the occurrence of a response. J. Genetic Psychol. 88, 31—36.
- Gelber B. and Rasch E. 1956c: Investigations of...: V. The effects of autogamy (nuclear reorganization). J. Comp. Physiol. Psychol. 49, 594—599.
- Gelber B. 1958: Retention in *Paramecium aurelia*. J. Comp. Physiol. 51, 110—115.
- Grabowski U. 1939: Experimentelle Untersuchungen über das angebliche Lernvermögen von *Paramecium*. Zeitschr. Tierpsychol. 2, 265—282.
- Grittner I. 1951: Zur Nahrungswahl der Infusorien, untersucht an *Paramecium caudatum* Ehrbg. und *Stentor coeruleus* Ehrbg. Biol. Zentralbl. 70, 128—151.
- Hempelmann F. 1926: Tierpsychologie vom Standpunkte des Biologen. Leipzig. Akadem. Verlagsges.
- Jennings H. S. 1899: Reactions to localized stimuli in *Spirostomum* and *Stentor*. Amer. Nat. 33, 373—389.
- Jennings H. S. 1906: Behavior of the lower Organisms. Columbia Univ. Press.
- Jensen D. D. 1957: Experiments on „Learning“ in *Paramecia*. Science 125, 191—192.

- Kafka G. 1914: Einführung in die Tierpsychologie auf experimenteller und ethologischer Grundlage. I. Die Sinne der Wirbellosen. Leipzig.
- Kafka G. 1922: Tierpsychologie. Handbuch der vergleichenden Psychologie. Bd. I. Abt. 1. München.
- Kinastowski W. 1963: Der Einfluss der mechanischen Reize auf die Kontraktilität von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Acta Protozool. 1, 201—222.
- Koltzoff N. K. 1911: Untersuchungen über die Kontraktilität des Stieles von *Zoothamnium alternans*. Biol. Zeitschr. Moskau. 2, 137.
- Krechewsky I. and Honzik C. H. 1932: Fixation in the rat. Univ. Calif. Publ. Psych. 6, 13.
- Lozina-Lozinski L. 1931: Zur Ernährungsphysiologie der Infusorien: Untersuchungen über die Nahrungswahl und Vermehrung bei *Paramecium caudatum*. Arch. Protistenk. 74, 18—120.
- Mast O. und Pusch L. C. 1924: Modification of response in *Amoeba*. Biol. Bull. 46, 55.
- Mast S. O. 1926: Reactions to light in *Volvox* with special reference to the process of orientation. Zeitschr. Vgl. Physiol. 4, 637—658.
- Mast S. O. 1927a: The effect of chemicals on form and locomotion in *Amoeba proteus*. Amer. J. Physiol. 81, 498—499.
- Mast S. O. 1927b: Reversal in photic orientation in *Volvox* and the nature of photic stimulation. Zeitschr. Vgl. Physiol. 5, 730—738.
- Mast S. O. 1927c: Response to electricity in *Volvox* and the nature of galvanic stimulation. Zeitschr. Vgl. Physiol. 5, 739—761.
- Mast S. O. 1932: Localized stimulation transmission of impulses, and the nature of response in *Amoeba*. Physiol. Zool. 5, 1—15.
- Mast S. O. and Stahler N. 1937: Light adaptation and Locomotion in *Amoeba proteus*. Biol. Bull. 73, 126—133.
- Metalnikow S. 1907: Über die Ernährung der Infusorien und deren Fähigkeit ihre Nahrung zu wählen. Trav. Soc. Imp. Nat. de St. Petersburg. 38, 181—187.
- Metalnikow S. 1914: Les Infusoires peuvent-ils apprendre a choisir leur nourriture? Arch. Protistenk. 34, 60—78.
- Metalnikow S. 1917: On the question regarding the capability of *Infusoria* to „learn” to choose their food. Russ. J. Zool. Petersburg. 2, 397.
- Neresheimer E. R. 1903: Über die Höhe der histologischen Differenzierung der heterotrichen Ciliaten. Arch. Protistenk. 2, 305.
- Pastori G. 1932: Ricerche sull' eccitabilità delle vorticelle. Arch. Sci. Biol. (Naples) 17, 145—163.
- Plavilstchikov N. N. 1928: Observations sur l'excitabilité des infusoires. Ruskij Archiv Protistologii 7, 1—24.
- Pütter A. 1904: Die Reizantwortungen der ciliaten Infusorien. Zeitschr. allg. Physiol. 3, 406—454.
- Neresheimer E. R. 1903: Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize. Extr. du Bull. de l'Acad. Pol. d. Sciences et d. Letters. Serie B. Kraków. 89—107.
- Smith S. 1908: Limits of educability in *Paramecium*. J. Comp. Neurol. Psychol. 18, 499—510.
- Soest H. 1937: Dressurversuche mit Ciliaten und Rhabdocoelen Turbellarien. Zeitschr. vergl. Physiol. 24, 720—748.
- Timofiejew N. N. 1958: Priobretennye reakcji u paramecij. Trudy Inst. Exp. Med. Leningrad 260—266.
- Tolman E. C. 1934: Backward elimination of errors in two successive discrimination habits. Univ. Calif. Publ. Psychol. 6, 145.
- Wawrzyńczyk S. 1937: Badania nad pamięcią *Spirostomum ambiguum major*. Acta Biol. Exp. 11, 57—77.
- Wawrzyńczyk S. 1938: Die Reaktionen von *Paramecium caudatum* auf Lichtreize. Trav. Soc. Sci. Wilno 12, 1—28.
- Władymirski A. 1916: Are the infusoria capable of „learning” to select their food? Journ. russ. de Zool. 1, 451.

Fasciculi praeparati:

S. L. Kazubski: Studies on the parasitic ciliate *Thigmocoma acuminata* Kazubski, 1958 (*Thigmotricha-Thigmocomidae*) [Badania nad pasożytniczym orzęskiem *Thigmocoma acuminata* Kazubski, 1958 (*Thigmotricha-Thigmocomidae*)] — J. Lom and J. Vávra: Fine morphology of the spore in *Microsporidia* [Ultrastruktura spor mikrosporidii] — I. B. Raikov, E. M. Cheissin and E. G. Buze: A photometric study of DNA content of macro- and micronuclei in *Paramecium caudatum*, *Nassula ornata* and *Loxodes magnus* [Фотометрическое изучение содержания ДНК в макро- и микронуклеусах *Paramecium caudatum*, *Nassula ornata* и *Loxodes magnus*] — L. Kuźnicki: Reversible immobilization of *Paramecium caudatum* evoked by nickel ions [Badania nad odwracalną immobilizacją *Paramecium caudatum* wywołaną przez jony niklawe] — M. Doroszewski: The response of *Dileptus* and its fragments to the puncture [Reakcja *Dileptus* i jego fragmentów na ukłucie] — A. E. Karapetjan: Determination of growth rate of *Lambliia intestinalis* cultivated in vitro [Определение темпа роста *Lambliia intestinalis* в культуре].

Państwowe Wydawnictwo Naukowe  
(PWN — Polish Scientific Publishers)  
Warszawa

Printed in Poland, DRP

## Fasciculi:

14. Z. Raabe: Systematics of the family <i>Urceolariidae</i> Dujardin 1841 [Systematyka rodziny <i>Urceolariidae</i> Dujardin 1841] . . . . .	121
15. Z. Raabe: La stomatogenèse chez <i>Conchophthirus</i> ( <i>Ciliata</i> , <i>Thigmotricha</i> ) [Stomatogeneza u <i>Conchophthirus</i> ( <i>Ciliata</i> , <i>Thigmotricha</i> )] . . . . .	139
16. M. Wolska: Morphology of the buccal apparatus in <i>Balantidium coli</i> (Malmsten 1857) [Budowa aparatu gębowego u <i>Balantidium coli</i> (Malmsten 1857)] . . . . .	147
17. J. Vávra: Spore projections in <i>Microsporidia</i> [Vyběžky spor u mikrosporidií] . . . . .	153
18. A. Grębecki and L. Kuźnicki: The influence of external pH on the toxicity of inorganic ions for <i>Paramecium caudatum</i> [Wpływ pH środowiska na toksyczność jonów nieorganicznych dla <i>Paramecium caudatum</i> ] . . . . .	157
19. Ю. И. Полянский: О способности инфузории тифельки ( <i>Paramecium caudatum</i> ) переносить отрицательные температуры [On the capacity of <i>Paramecium caudatum</i> to stand the sub-zero temperatures] . . . . .	165
20. L. Kuźnicki: Recovery in <i>Paramecium caudatum</i> immobilized by chloral hydrate treatment [Powrót <i>Paramecium caudatum</i> do normy po immobilizacji wodzianem chloralu] . . . . .	177
21. M. Doroszewski: Some features of the ciliary activity in <i>Dileptus</i> [O pewnych właściwościach ruchu rzęskowego u <i>Dileptus</i> ] . . . . .	187
22. S. Dryl: Oblique orientation of <i>Paramecium caudatum</i> in electric field [Orientacja skośna <i>Paramecium caudatum</i> w polu elektrycznym] . . . . .	193
23. W. Kinastowski: Der Einfluss der mechanischen Reize auf die Kontraktilität von <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg. [Wpływ bodźców mechanicznych na kurczliwość <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg.] . . . . .	201
24. W. Kinastowski: Das Problem „des Lernens” bei <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg. [Zagadnienie „uczenia się” u <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg.] . . . . .	223