

Nachdruck verboten.

Übersetzungsrecht vorbehalten.

(Mitteilung aus dem Zoologischen Institut der Universität Breslau.)

Untersuchungen über *Opalina*.

Von

Stefan Konsuloff,

Privatdozent der Zoologie an der Universität Sofia.

(Hierzu Tafel 12 u. 13 und 6 Textfiguren.)

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	286
Methoden	287
Züchtung der Opalinen	288
Untersuchte Arten	290
<i>Opalina zelleri</i> NERESHEIMER	291
Abnormitäten	293
Bau der Opalinen	294
A. Pellicula	294
B. Ectoplasma	295
C. Entoplasma	299
Bewegungen der Opalinen	300
Kerne und Kernsubstanzen	301
A. Micronuclei, Chromidienbildung	301
B. Macronuclei	304
Ernährung der Opalinen	310
Excretion der Opalinen	312
A. Excretionskörperchen	312
B. Excretionskanäle	313
Reizbiologie	314
Vermehrung der Opalinen durch Teilung	318
Cystenbildungen	319
A. Dauercysten von Opalinen	319
B. Bildung von Infektionscysten	323

	Seite
C. Anlaß zur Bildung von Infektionscysten	324
D. Direkte Umwandlung von Infektionscysten in Agamonten	327
Geschlechtliche Vorgänge	327
A. Gametenbildung	327
B. Copulation	331
C. Folgeerscheinungen der Copulation	333
Der Entwicklungskreis von <i>Opalina ranarum</i>	334
Systematische Stellung der Opalinen	335
Zusammenfassung der Hauptergebnisse	337
Anhang	339
Literaturverzeichnis	341
Tafelerklärung	343

Einleitung.

Unter den Infusorien stellen die Opalinen ein Untersuchungsobjekt dar, das von vielen Autoren in Angriff genommen worden ist. Nächst den Angaben der älteren Forscher finden wir die Beobachtungen von ENGELMANN (10), der schon im Jahre 1876 die Entwicklungsstadien der Opalinen in den Kaulquappen gefunden hat. 1877 gibt uns ZELLER (52) eine sehr genaue Arbeit über den Bau und die Entwicklung der meisten Opalinen, die die Basis unserer Kenntnisse über diese Tiere darstellt. Die späteren Untersuchungen von TÖNNIGES (49), KUNSTLER und GINESTE, MAIER (32), LÖWENTHAL (30, 31) LÉGER und DUBOSQ (27), SCHNEIDER (44) u. a. trugen viel zur Klärung der Körperstruktur der Opalinen bei. 1906 gelang es NERESHEIMER (38) Gametenbildung und Kopulation auch hier nachzuweisen, was von METCALF (35) später bestätigt wurde, der sehr eingehende cytologische Untersuchungen über die Opalinen gemacht hat. Mehrere Autoren, wie ENTZ (11), VERWORN (51), WALLENGREN (53) u. a. erforschten die Reizbarkeit der Opalinen. PÜTTER (43) machte Versuche über die anaerobe Atmung; diesem Forscher gelang es zum erstenmal, die Opalinen außerhalb des Wirtes längere Zeit lebend zu erhalten.

Trotz aller dieser Arbeiten über die Opalinen, blieben noch viele ungeklärte oder sehr bestrittene Fragen über ihre Struktur und Biologie übrig. Über die Frage nach der Beschaffenheit der Pellicula in Zusammenhang mit der Bewegung der Tiere, wie auch über die Frage nach dem Körpergerüst waren die Forscher nicht einig. Die Struktur des Ectoplasmas war sehr verschieden beschrieben und über die Rolle der dort befindlichen Vakuolen war

nichts bekannt. Die Deutung der Ectoplasmaeinschlüsse blieb noch ganz ungeklärt und die Kerne wurden einmal als Macro-, ein anderes Mal als Micronuclei, von wieder anderen Forschern für beides gehalten. Der Behauptung, daß bei den Opalinen Isogamie vorkommt, stellen andere Autoren ihre Beobachtungen über die Anisogamie dieser Tiere gegenüber. Die Bedeutung und der Prozeß der Chromidienausscheidung, die hier so oft beobachtet wird, wird auch umstritten. Die Encystierung der Opalinen ist noch sehr ungenügend erforscht. Der Entwicklungskreis ist auch nicht vollkommen geklärt. Über die systematische Stellung dieser Protozoen streitet man auch. Auf alle diese noch nicht genügend klaren Seiten unserer Kenntnis der Opalinen Licht zu werfen, ist der Zweck meiner Untersuchungen.

Ich erfülle eine angenehme Pflicht, indem ich meinem Lehrer, Herrn Geh. Rat Prof. Dr. FR. DOFLEIN, in dessen Institut ich diese Arbeit ausführen konnte, für seine vielen wertvollen Anregungen und das stets hilfsbereite Interesse, mit dem er am Fortschreiten der Arbeit teilnahm, meinen aufrichtigsten Dank ausspreche.

Methoden.

Zur Beobachtung in vivo benutzte ich hauptsächlich Material von *Opalina ranarum* und *Op. dimidiata*. Die Tiere ließ ich nie im Wasser, wo sie sich ändern und bald sterben, sondern setzte sie in die PÜTTER'sche Flüssigkeit (s. u.), die ich auch zur Züchtung der Opalinen verwendete. Dort leben die Tiere sehr lange Zeit ganz normal. Da die Opalinen in der Natur fast anaerob leben, wurde die Flüssigkeit vor dem Gebrauch immer aufgeköcht und abgekühlt.

Op. dimidiata war ein sehr günstiges Objekt zur Beobachtung der Macronuclei und des Körpergerüsts. Zum Vergleich der Vitalfärbung wurden außer den genannten Arten auch *Op. intestinalis* und *Op. caudata* benutzt. Die Bewegungen der Tiere wurden bei *Op. ranarum*, *Op. dimidiata* und *Op. intestinalis* verfolgt. Die Versuche über die Taxien machte ich an *Op. ranarum* und *Op. dimidiata*.

Die Opalinen aus den Kaulquappen wurden auch in PÜTTER'scher Flüssigkeit untersucht. Dort befinden sie sich wohl und die Gametenbildung und Copulation ist in diesem Medium sehr deutlich zu verfolgen.

Zur Fixierung verwendete ich hauptsächlich Sublimateisessig, SCHAUDINN'sche Mischung, Pikrinessigsäure und FLEMMING's starke Lösung. Die besten Resultate bekam ich mit der FLEMMING'schen Lösung und dem Sublimateisessig. Diese Fixiermittel aber waren

nicht sehr geeignet zur Fixierung der Cysten, wo ich mit besserem Erfolg Pikrinessigsäure benutzte.

Zur Färbung in toto gebrauchte ich Borax-Carmin und Hämatoxylin nach DELAFIELD. Das letztere gab mir immer bessere Resultate. Ich färbte meistens mit außerordentlich verdünnten Lösungen, wobei ich später gar nicht oder ganz leicht mit Salzsäure differenzierte (ein Tropfen konzentrierte Salzsäure auf eine PETRI-Schale destilliertes Wasser). Die Färbung mit schwach verdünnter oder ganz konzentrierter Lösung von Hämatoxylin nach DELAFIELD mit nachträglicher langer Differenzierung habe ich auch oft benutzt. Die Resultate aber mit stark verdünnten Lösungen halte ich für besser.

Ausstrichpräparate von Opalinen, besonders aus dem Kaulquappendarm, wurden oft mit Erfolg gemacht. Mit der Masse von Frosch- oder Kaulquappendarm wird das Gläschen dünn bestrichen und kurze Zeit danach, bevor das Präparat ganz eintrocknet, die Flüssigkeit aufmerksam daraufgegossen.

Zu den meisten cytologischen Beobachtungen aber sind Schnitte erforderlich. Das Einbetten machte ich nach dem Verfahren von MAIER in kleinen, 1—2 cm langen und 2—3 cm breiten Glasröhrchen (32).

Zur Färbung der Schnitte verwendete ich wiederum mit besserem Erfolg sehr stark verdünnte Lösungen von Hämatoxylin nach DELAFIELD, als stärkere Lösungen derselben Farbe. Zur Beobachtung der Kernstrukturen aber färbte ich mit Eisenhämatoxylin nach HAIDENHAIN oder noch besser mit alkoholischem Hämatoxylin nach DOFLEIN (1 Teil 4proz. wässrige Hämatoxylinlösung mit 10 Teilen 70proz. Alkohol verdünnt; 1 Teil 2½proz. Eisenalaunlösung mit 10 Teilen 50proz. Alkohol verdünnt. Beizung und Färbung ungefähr je 20 Minuten). Die besten Resultate bekam ich mit der Färbung nach DOFLEIN aber mit außerordentlich verdünnten Lösungen (die Farblösung nach DOFLEIN noch 8—10 mal verdünnt), worin ich die Schnitte einige Stunden (bis 24 Stunden) liegen ließ. Nach der Differenzierung färbte ich mit alkoholischem Eosin nach. Diese Gegenfärbung gab mir die Möglichkeit, die Teilung der Macronuclei, die Struktur der Pellicula, wie auch das Körpergerüst deutlich zu beobachten.

Züchtung der Opalinen.

In reinem Wasser leben gewöhnlich die Opalinen nur einige Stunden. Wenn man zu dem Wasser Darminhalt zusetzt, kann man

sie etwas länger am Leben erhalten, doch können sie auch in solchem Medium nicht gezüchtet werden.

Die Opalinen leben aus zwei Gründen nicht in reinem Wasser. Einerseits ist der osmotische Druck des reinen Wassers ihnen nicht günstig; andererseits vertragen sie die im Wasser aufgelöste Luft nicht, da sie in der Natur in einer beinahe sauerstofffreien Umgebung leben, und sich fast wie anaerobe Parasiten verhalten. Mit verschiedenen Salzen kann man eine passende Zusammensetzung der Flüssigkeit erzielen, worin die Opalinen gut gedeihen. Am besten ist die Flüssigkeit nach PÜTTER (43), der folgende Lösung empfiehlt:

Kochsalzlösung	0,8 Proz.	100 Teile
Seignettesalz	30 "	5 "
destilliertes Wasser		400 "

Dieser Forscher macht seine Versuche mit *Op. ranarum* in absolut sauerstofffreier Flüssigkeit, zu welchem Zweck er mittels spezieller Vorrichtungen auch die letzten Spuren von Sauerstoff vertreibt. Ohne Nahrung hat er die Opalinen 3—7 Tage am Leben erhalten; als er der Flüssigkeit gekochtes Eiweiß zusetzte, lebten die Opalinen 13—20 Tage.

Diese Flüssigkeit benutzte ich zur Züchtung der Opalinen. Ich gebrauchte aber keine speziellen Apparate, die ein absolut sauerstoffreies Medium sichern, da auch im Froschdarm das Medium nicht absolut sauerstofffrei ist. Es genügt vollständig, wenn die PÜTTER'sche Flüssigkeit gut aufgeköcht und jeden Tag gewechselt wird. Wenn die Flüssigkeit viel Luft enthält, gehen die Kulturen bald ein. Einige Male setzte ich zwei Kulturen an: eine in aufgeköchter Flüssigkeit, die andere in derselben Flüssigkeit, die ich aber mit der Pipette durchlüftet hatte. Nach 24—48 Stunden war die zweite Kultur schon abgestorben, die Kontrollkultur lebte ganz normal.

Die Tiere züchtete ich in kleinen, ca. 4 cm langen und 8 mm breiten Reagenzgläsern, deren untere Hälfte spitz ausgezogen war wie bei den Zentrifugalgäsern. Diese Form ist sehr bequem, weil sich die Tiere am Boden sammeln und man, besonders nach leichtem Zentrifugieren, fast die ganze Flüssigkeit wechseln kann, ohne Gefahr, die Tiere zu verlieren. Die Röhrchen waren mit Kork- oder Gummistöpsel luftdicht geschlossen. Wenn man Gummistöpsel verwendet, muß man aufpassen, daß die Flüssigkeit beim Zustopfen nicht gedrückt wird; das vermeidet man am leichtesten mit einer Nadel, die zwischen Glas und Gummistöpsel hineingeschoben und

nachher wieder herausgezogen wird. Ohne diese Vorsichtsmaßregeln können die Kulturen leicht eingehen: beim unvorsichtigen Zustopfen sterben die Opalinen gewöhnlich nach kurzer Zeit, manchmal nach 24 Stunden, ab.

Als Nahrung verwendete ich rohe oder abgekochte Froschdarmflüssigkeit und rohes oder abgekochtes Eiweiß. Mit abgekochter PÜTTER'scher Flüssigkeit wurde der Froschdarm durchspült und nach der Zentrifugierung die Flüssigkeit frisch den Tieren gegeben oder in kleinen Gläschen sterilisiert: jede Kultur bekam, nachdem die Flüssigkeit gewechselt worden war, einen Tropfen von diesem Nahrungsbouillon. Das steril abgenommene und in kleinen Serumgläschen aufbewahrte Eiweiß wurde vor dem Gebrauch mit Glaspulver fein zerrieben, mit PÜTTER'scher Lösung verdünnt und ziemlich stark zentrifugiert. Dabei entstand eine milchige Flüssigkeit, die sich oberhalb des Niederschlages sammelte; diese verwendete ich zur Fütterung der Opalinen. In einer ähnlichen Weise fand auch das gekochte Eiweiß Verwendung. Alle Kulturen wurden bei Zimmertemperatur im Dunkel gehalten.

Auf die beschriebene Weise kann man die Opalinenkultur lange Zeit erhalten. Eine am 11. Dezember 1920 angesetzte Kultur, die ich mit Froschdarmflüssigkeit fütterte, lebte bis zum 1. Februar 1921. Eine andere Kultur, die ich auch am 11. Dezember 1920 angesetzt hatte, die aber mit Eiweiß gefüttert wurde, habe ich 2 Monate (bis zum 10. Februar 1921) geführt und dann vernichtet, weil ich sie nicht mehr brauchte. Bei aufmerksamem Behandeln kann man also die Kulturen monatelang führen. Die Ursache, daß bei den Versuchen von PÜTTER die Opalinen nur 13—20 Tage lebten, erblicke ich darin, daß dieser Forscher die Flüssigkeit nicht gewechselt hat. Die Tiere sind infolge der eingetretenen Fäulnis gestorben, was auch bei meinen Kulturen der Fall war, wenn ich absichtlich die Flüssigkeit mit der Nahrung einige Tage ungewechselt ließ.

Wenn die Opalinen sich in den Kulturen gut befanden, vermehrten sie sich gewöhnlich und keine Abnormitäten traten auf. In den meisten Fällen aber waren die Opalinen der Kulturen etwas kleiner als die im Froschdarm lebenden.

Untersuchte Arten.

Als Hauptuntersuchungsobjekt habe ich *Op. ranarum* benützt. Diese große Art kommt gewöhnlich in Mengen in *Rana temporaria*

vor, wo sie das ganze Jahr hindurch beobachtet werden kann. Wenn auch nicht alle, so war doch die Mehrzahl der untersuchten Frösche infiziert. Diese Opaline hat viele Micronuclei, die etwas kleiner als die der zweikernigen Arten sind, aber noch genügend groß zu cytologischen Zwecken. Ferner ist diese Art sehr geeignet zur Untersuchung der Myoneme, die hier stark entwickelt sind. Einen besonderen Vorteil bietet *Op. ranarum* dar, weil sie sich verhältnismäßig am leichtesten züchten läßt. Auch findet die Bildung von Infektionseysten noch im Frühjahr statt, so daß man diese Art zur Untersuchung der Geschlechtsvorgänge am frühesten im Jahr verwenden kann.

Op. dimidiata aus *Rana esculenta* läßt sich schwerer züchten, hat auch noch kleinere Micronuclei. Zur Untersuchung der Micronuclei und des Körpergerüsts dagegen ist sie sehr geeignet, wie auch zur Verfolgung der Bildung von Dauercysten. Die Opalinen aus *Bombinator*, nämlich *Op. intestinalis* und *Op. caudata* wurden von mir hauptsächlich als Vergleichsobjekte bei den Untersuchungen verwendet.

Opalina zelleri, NERESHEIMER.

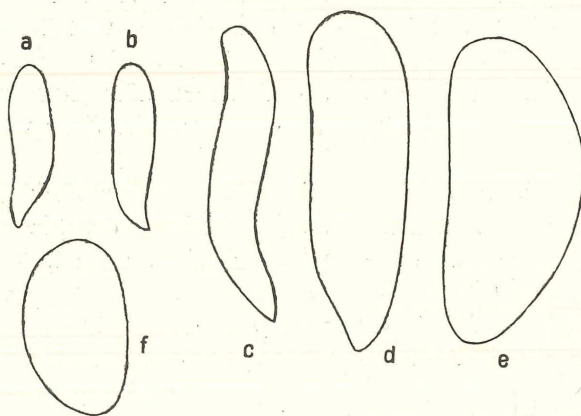
Unter den *Op. dimidiata* fand ZELLER (52, p. 368) Individuen, die sehr kurz und dick waren und nicht wie gewöhnlich spindel-, sondern warzenförmig erschienen. Wenn solche Tiere etwas vom Deckglas gedrückt werden, können sie sogar gewisse Ähnlichkeit mit *Op. ranarum* bekommen. ZELLER glaubt, daß wir hier nicht eine bloße Varietät von *Op. dimidiata* vor uns haben, sondern vielleicht eine besondere Art dieser Gattung. Ferner bemerkt derselbe Autor, daß die Fortpflanzung dieser Formen genau so wie bei den typischen *Op. dimidiata* vor sich geht.

NERESHEIMER (38, p. 5) hält diese Opaline für verschieden von *Op. dimidiata* und nennt sie *Op. zelleri*.

METCALF (35, p. 317) hat zweimal dieselben Formen beobachtet und zwar immer mit *Op. dimidiata* zusammen, was auch ZELLER schon festgestellt hatte. Er weist darauf hin, daß in der feinen mikroskopischen Struktur beider Arten kein Unterschied besteht. Und er scheint nicht ganz sicher zu sein, ob diese zwei Arten als solche genügend charakterisiert sind.

Op. zelleri habe ich auch beobachtet, immer mit *Op. dimidiata* zusammen. Eine nähere Untersuchung der in der Mehrzahl vorhandene *Op. dimidiata* ergab, daß viele Übergangsformen zwischen beiden Arten da waren, was aus den beigegebenen Figuren ersicht-

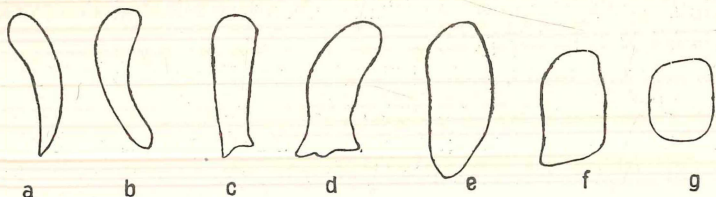
lich ist (Textfig. 1). Neben den gewöhnlichen spindelförmigen Individuen (a) findet man solche, deren Körper etwas mehr cylindrisch ist (b). Solche cylindrische Tiere, aber beträchtlich größer (c), bilden eine Zwischenstufe zu den großen walzenförmigen Individuen (d). Diese „*Op. zelleri*“ sind manchmal nicht ganz cylindrisch, sondern



Textfig. 1.

Übergang zwischen *Op. dimidiata* und *Op. zelleri* aus dem Darm von *R. esculenta*. (LEITZ Obj. 3, Oc. 3.)

in der Mitte erheblich dicker (e). Eine weitere Formänderung tritt ein, wenn die Längsachse stark verkürzt ist (f). Bei dieser Formenreihe war es schwer zu sagen, welche Individuen als *Op. dimidiata* und welche als *Op. zelleri* bezeichnet werden müßten. Es lag die Vermutung nahe, daß wir es hier nur mit verschiedenen Formen von *Op. dimidiata* und nicht mit verschiedenen Varietäten oder Arten zu tun haben. Die Entwicklungsbedingungen, die bei allen Froschindividuen nicht immer gleich sind, und vor allem die Ernährungsbedingungen halte ich für die Ursache dieser Erscheinung. Um das zu prüfen, untersuchte ich die Form der



Textfig. 2.

Übergang zwischen *Op. dimidiata* und *Op. zelleri* aus Kulturen. (LEITZ Obj. 3, Oc. 3.)

Tiere in manchen meiner Kulturen von *Op. dimidiata* und konnte das Erscheinen derselben Übergangsformen zwischen dem *Op. dimidiata*-Typus und *Op. zelleri*-Typus feststellen (Textfig. 2). Wie es gewöhnlich bei den Kulturen von Opalinen der Fall ist, waren diese Individuen etwas kleiner als jene, die in der Natur beobachtet werden.

Das Verhältnis aber der Länge zur Breite des Körpers war wie bei den oben beschriebenen zwei Arten; hier fand ich sogar das Verhältnis 1:1 (g), was ich bei den aus dem Froschdarm herausgenommenen Exemplaren nicht beobachtet habe. Es ist interessant zu bemerken, daß bei den *Op. dimidiata* von „zelleri“-Typus, die in den Kulturen entstanden, auch die Einstülpung des breiten Hinterandes oft zu finden war (c, d) was METCALF für ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden Arten hält.

Die obigen Beobachtungen bringen mich zu der Überzeugung, daß die in Frage kommenden plumpen *Op. dimidiata*-Formen weder eine besondere Art, noch eine Varietät, sondern wahrscheinlich nur Ernährungsformen von *Op. dimidiata* vorstellen. Leider kann ich vorläufig nicht etwas Näheres über den Einfluß der Ernährung auf die Körperformbildung angeben.

Abnormitäten.

In der Natur findet man nicht selten Abnormitäten von Opalinen. Besonders ist das der Fall während der Zeit der Infektionscystenbildung. Man beobachtet Tiere mit unregelmäßigen Konturen, mit Auswüchsen an verschiedenen Stellen, bei *Op. ranarum* auch Löcher hier und da am blattähnlichen Körper. Abnormitäten kommen auch bei der Gametenbildung vor, wie NERESHEIMER (38, p. 26) erwähnt.

Die Abnormitäten in der Natur zeigen, daß die Entwicklungsbedingungen und vor allem die Ernährungsbedingungen ungünstig sind. Dafür, daß darin eben die Ursache liegt, spricht auch die Tatsache, daß auch in den Kulturen Abnormitäten auftreten, wenn die Bedingungen ungünstig werden. In den Kulturen, denen keine Nahrung gegeben wird, erscheinen in den letzten Tagen vor dem Absterben sehr viele Abnormitäten. Und wenn es manchmal auch in den anderen Kulturen zu Abnormitätenbildungen kam, war das schon ein Zeichen dafür, daß solche Kulturen bald eingehen würden (Textfigur 3).



Textfig. 3. Abnormität bei *Op. dimidiata* in Kulturen.

(LEITZ Obj. 3, Oc. 3.)

NERESHEIMER zeigt in Fig. B (p. 26) eine Abnormität bei der Gametenbildung von *Op. dimidiata*, die METCALF (35, p. 294) aber als

Anisogamie-Copulationsmoment betrachtet. Daß NERESHEIMER die Anisogamie der Opalinen nicht beobachtet hat und unrichtig von Isogamie spricht, darauf werde auch ich an einer anderen Stelle hinweisen. Daß aber solche Abnormitäten, wie sie NERESHEIMER abgebildet hat, wirklich auch bei der Gametenbildung vorkommen können, das kann ich bestätigen. Ich habe eine ganze Menge von Anisogamie-Copulationsmomenten bei *Op. ranarum* beobachtet; ich fand aber am zweiten Tag nach der Infektion der Kaulquappen mit Cysten, als noch keine fertige Macro- und Microgameten da waren, wie NERESHEIMER Abnormitäten (Taf. 13 Fig. 17).

Die Abnormitätenbildung bei den Opalinen muß also als eine Erscheinung betrachtet werden, die in allen Entwicklungsstadien, aber am meisten bei der Infektionscystenbildung eintreten kann.

v. LINDEN (29) hat in der Natur bei *Op. ranarum* (die er irrümlicherweise als *Op. dimidiata* bezeichnet) viele Individuen mit fingerförmigen Auswüchsen beobachtet, die er für Tastorgane ansieht. Die Tatsache, daß man in den Kulturen mit schlechter Ernährung solche Formen erzeugen kann, zeigt uns deutlich, daß die Auffassung v. LINDEN nicht begründet ist.

Bau der Opalinen.

A. Pellicula.

Von verschiedenen Forschern wurde die Frage umstritten, ob bei den Opalinen die Pellicula mit Myonemen versehen ist.

Die Anwesenheit von Myonemen bei *Op. ranarum* wurde zuerst von ZELLER (52, p. 354) angegeben. Er gibt die Beschreibung wie auch Abbildungen von „breiten muskulösen“ Fasern, die schräg verlaufen und den ganzen Körper bedecken. Nach ZELLER sollen sie auch die eigentliche Pellicula ersetzen (die nach ihm fehlt), indem die dicht nebeneinander liegenden Faserräder als eine homogene Pellicula erscheinen können.

MAIER (32, p. 80) gibt eine eingehende Beschreibung der Pellicula bei *Op. ranarum*. Nach seinen Beobachtungen ist sie ununterbrochen, hat Längsfurchen, aus denen die Cilien hinausragen. Zwischen diesen Längsfurchen befinden sich Zwischenräume, in denen wiederum 3—4 kleinere Längsfurchen sichtbar sind. Zwischen diesen bilden sich Längsleisten, die eine feine Querstreifung aufweisen. Es existieren keine „muskulöse Bänder“ im Sinne von ZELLER; was ZELLER als solche gedeutet hat, hält er für die Pellicula selbst. METCALF (35, p. 211), der aber über *Op. ranarum* nicht

gearbeitet hat, teilt auch MAIER's Meinung, daß bei den Opalinen keine Myoneme vorhanden sind, und daß ZELLER als solche nur die Zwischenräume zwischen den Cilienreihen gedeutet hat.

Die Beobachtung über die Bewegungen der Opalinen, wobei sich verschiedene Körperteile in ganz bestimmter Weise biegen, zeigen uns, daß die Pellicula Myoneme besitzen muß. Die Präparate, die ich mit Eisenhämatoxylin nach DOFLEIN gefärbt und mit Eosin nachgefärbt hatte, gaben mir die Möglichkeit, den Bau der Pellicula näher zu studieren und die Anwesenheit der Myoneme festzustellen. Bei Flächenschnitten (Taf. 12 Fig. 1 b) sind die Längsfurchen sichtbar, in denen sich die Cilien befinden. Zwischen diesen Furchen sind 3—4 Myoneme erkennbar, die selbst nicht quer gestreift sind. So gestreift ist die Membran, die darunter liegt, so daß die Myoneme gestreift erscheinen, wenn man das Objektiv nicht genau einstellt (Fig. 1 a). Bei genauer Einstellung aber kann man zuerst die quergestreifte Membran (Fig. 1 c) und dann die ungestreiften Myoneme (Fig. 1 b) sehen, wenn man die Pellicula von der inneren Seite beobachtet. Sind die Myoneme erschlaft (Taf. 12 Fig. 2, 3), sehen sie in Querschnitt wie kleine Rippen und Furchen aus, wie sie auch MAIER richtig abgebildet hat (seine Taf. III, Fig. 1 c). Beim Zusammenziehen liegen die Myoneme zwischen zwei Furchen so dicht nebeneinander, daß sie wie ein einziges Bündel aussehen, indem die Scheidungsquerlinien die Zahl der Myoneme zeigen (Taf. 12 Fig. 4). In diesem Zustande rücken die Myonemengruppen auseinander, so daß der Zwischenraum zwischen ihnen, von wo die Cilien ausgehen, noch deutlicher wird. Diesen Zustand der Myoneme hat MAIER nicht beobachtet und deshalb hielt er die erschlaften Myoneme, die er sah, für die Pellicula selbst. Seine Zeichnung der Pellicula ist nur deshalb nicht ganz korrekt, weil er die „Längsleisten“, d. h. die Myoneme, und die darunter liegende quergestreifte Membran in einer Ebene darstellt. Im Vergleich zu den Myonemen anderer Infusorien weisen die Myoneme der Opalinen die Eigentümlichkeit auf, daß sie in Bündeln zu 3—4 gruppiert sind.

B. Ectoplasma.

Die Struktur des Ectoplasmas der Opalinen wird von verschiedenen Forscher verschieden angegeben, je nachdem, ob sie die Ectoplasmavakuolen beobachtet haben oder nicht. TÖNNIGES (49) hat diese Vakuolen bei *Op. ranarum* beschrieben und abgebildet, wobei er keine Einschlüsse in ihrem Innern erwähnt. Dagegen hat ZELLER auch bei *Op. ranarum* das Ectoplasma als „völlig homogen glashell“ ge-

sehen (54, p. 325). MAIER (32, p. 81) ist mit HÜTSCHLI (3, p. 1278) darüber einverstanden, daß das Corticalplasma bei dieser Art einen sehr feinwabigen, alveolären Bau besitzt. Er bemerkt, daß seine Untersuchungen gegen die Befunde von TÖNNIGES sprechen, der die Ectoplasmaschicht als grob vakuolär zeichnet. Nach MAIER ist „Corticalplasma stets ebenso feinwabig gebaut wie das Entoplasma und von diesem lediglich durch den Mangel an Inhaltskörpern unterschieden“ (S. 81). MAIER hat also keine Spur von den Ectoplasma-vakuolen gesehen. NERESHEIMER fand in vielen Präparaten das Ectoplasma mit der von TÖNNIGES beschriebenen Struktur. Er nimmt aber an, daß das Ectoplasma solch ein Aussehen nur in den Stadien besitzt, die mit der Fortpflanzung in Zusammenhang stehen. METCALF (34, p. 113; 35, p. 213) schenkt besondere Aufmerksamkeit den Ectoplasma-vakuolen und -kügelchen und gibt eine ausführliche Beschreibung derselben. Alle Schnitte von Opalinen, die er untersucht hat, enthielten solche Gebilde. Opalinen ohne Ectoplasma-vakuolen und -kügelchen kennt er nicht und glaubt, daß MAIER solche nicht gesehen hat, weil er seine Präparate nur mit Eisenhämatoxylin färbte, das nach METCALF für das Ectoplasma kein befriedigendes Färbemittel ist. METCALF findet im Innern der Ectoplasma-vakuolen stets feste Gebilde, die er Ectoplasma-kügelchen („ectosarc spherules“) nennt, sie besitzen nach ihm keine besondere Struktur, mit Ausnahme einiger dunkler gefärbten Punkte an den Rändern. Er ist geneigt anzunehmen, daß die Kügelchen als eine flüssigere Substanz ursprünglich die ganze Vakuole ausgefüllt haben und infolge der Behandlung zusammengeschrumpft sind. Die Bedeutung der Ectoplasma-vakuolen und -kügelchen ist METCALF nicht bekannt. Er weist aber darauf hin, daß sie kein Lecithin enthalten und daß sie andererseits in keinem Zusammenhang mit dem Excretionsapparat stehen können.

Die Ectoplasma-vakuolen und -kügelchen habe ich in vivo wie auch an gefärbten Präparaten untersucht. Sie lassen sich mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gut färben; am besten aber kann man sie mit Eisenhämatoxylin nach DOFLEIN färben, wobei das Präparat mit alkoholischer Eosinlösung nachgefärbt wird.

Ich muß zuerst bemerken, daß die Ectoplasma-vakuolen mit den Kügelchen manchmal auch ganz fehlen. In diesem Fall kann das Ectoplasma genau jene Struktur zeigen, die MAIER beobachtet und abgebildet hat (seine Taf. III Fig. 1 b, 1 c; Co) und die auch ich an Taf. 12 Fig. 12 dargestellt habe. Öfters aber sind die genannten Vakuolen vorhanden und mit Kügelchen versehen, die verschiedene

Form aufweisen. Gewöhnlich findet man die Kügelchen etwas verlängert, in der Mitte der Vakuolen liegend (Taf. 12 Fig. 13), ohne daß sie irgend welche besondere Struktur zeigen. Neben diesen Kügelchen, die scheinbar frei in den Vakuolen liegen, habe ich auch solche gefunden, die mit einer Verlängerung an der Vakuolenwand befestigt sind (Taf. 12 Fig. 14). Manchmal können sogar zwei solcher Kügelchen in einer Vakuole vorhanden sein. Ein ganz charakteristisches Bild zeigt ein zweiter Typus von Ectoplasmakügelchen. Hier stellt das Kügelchen eine in die Mitte der Vakuole gestellte feste Masse dar, die voll von kleinen, stärker färbbaren Körnchen ist (Taf. 12 Fig. 15).

Die Ectoplasmakügelchen dürfen wir nicht mit einer anderen Art von Ectoplasmagebilden verwechseln, die ich bei Opalinen gefunden habe und die eine ganz andere Bedeutung haben. Das sind fadenförmige Stränge, die von der Pellicula ausgehen, durch das Ectoplasma ziehen und bis zur äußersten Schicht des Entoplasma gelangen, wo sie verschwinden. Diese Stränge halte ich für Ströme von durch die Pellicula aufgenommenen Nahrungslösungen (Taf. 12 Fig. 11).

Von den beschriebenen Formen von Ectoplasmakügelchen waren bis jetzt nur die frei in den Vakuolen liegenden bekannt, die keine innere Struktur besaßen. Um auf die Bedeutung dieser Vakuolen und Kügelchen Licht zu werfen, habe ich das Verhalten derselben bei verschiedenen Umständen *in vivo* auch in Präparaten zu verfolgen gesucht.

Eine Kultur von *Op. ranarum* wurde (im Monate Dezember) mit ungekochtem Eiweiß gefüttert; eine zweite ohne Nahrung gelassen. In der ersten Kultur traten die Ectoplasmavakuolen so massenhaft und stark entwickelt auf, daß ich sie ohne Färbung beobachten konnte (Taf. 13 Fig. 1). In der zweiten Kultur, die ich am dritten Tag beobachtet habe, war das Ectoplasma der Opalinen schon von einem gleichmäßigen Aussehen, ohne Vakuolen. Dann nahm ich einen Teil von den Opalinen der ersten Kultur und ließ sie hungern; bald kam es zur Rückbildung der Vakuolen. Die starke Entwicklung der Vakuolen bei reichlicher Nahrung, ihre Rückbildung oder ihr Verschwinden beim Hunger zeigen, daß sie vorübergehende Gebilde des Ectoplasmas sind, die in irgendwelchem Zusammenhang mit dem Ernährungsprozesse stehen. Sehr oft habe ich eine Verlängerung dieser Vakuolen, die manchmal einem Kanälchen ähnelten, in der Richtung nach der Pellicula beobachtet. Sind die Vakuolen aus aufgenommener Flüssigkeit gebildet, oder stellen sie umgekehrt Stoffe dar, die nach außen entleert werden müssen? Die erste An-

nahme scheint mir unwahrscheinlich. Die durch Osmose aufgenommene Nahrung braucht nicht eine Zeitlang im Ectoplasma zu bleiben, um später dem Entoplasma übergeben zu werden. Die feinen Stränge von schwach färbbarer Substanz, die ich im Entoplasma gefunden habe und die von der Pellicula aus nach dem Entoplasma ziehen, scheinen vielmehr die aufgenommene Nahrung darzustellen. Ich bin geneigt, anzunehmen, daß die Vakuolen im Ectoplasma ihren Inhalt nach außen entleeren müssen. Andererseits hat PÜTTER schon darauf hingewiesen, daß die Opalinen feste Nahrungssubstanzen verdauen können, also extracellulär durch irgendwelche ausgeschiedenen Fermente. METCALF (35, p. 340) zweifelt daran, daß diese Verdauung solchen Fermenten zuzuschreiben ist. Er ist geneigt anzunehmen, daß hier die Bakterien die Zersetzung des Eiweißes herbeiführen und die Opalinen nur die fertigen Spaltungsprodukte durch Osmose aufzunehmen haben. Wie ich an anderer Stelle besprechen werde, ist die Fähigkeit der Opalinen extracellulär zu verdauen, sehr wohl möglich. Und die Flüssigkeit der Ectoplasmavakuolen, die eben bei starker Fütterung so massenhaft auftreten, scheint mir das Verdauungsferment zu sein, das nach außen ausgeschieden werden muß.

In vivo sind die Kügelchen der Vakuolen nicht zu unterscheiden. Die Beobachtung von METCALF (35 p. 212), daß in den lebenden Opalinen die Kügelchen eine mehr flüssige Substanz darstellen, die die ganzen Vakuolen ausfüllt, bei der Behandlung der Präparate zusammenschrumpft und die Kügelchen selbst bildet, scheint mir sehr wahrscheinlich. Bei dieser Zusammenschrumpfung kann die Masse sich von der Vakuolenwand lostrennen oder wie ich gezeigt habe, an manchen Stellen an dieser Wand hängen bleiben. Die Vakuolen sind also solche Punkte im Ectoplasma, wo sich flüssige Substanzen sammeln, um später nach außen entleert zu werden.

Die Ausscheidungen aber des Ectoplasmas sind nicht bloß mit den Ernährungsprozessen verknüpft. Bei den Encystierungen verschiedener Art, die bei den Opalinen zustandekommen, ist das Ectoplasma auch beteiligt. Eine Dauercyste von *Op. dimidiata*, die im Stadium, das an Taf. 12 Fig. 10 dargestellt ist, also im Momente der starken Ausscheidung von Hüllenmasse, habe ich fixiert und geschnitten. Eine Art von Ectoplasmavakuolen war auch da. Das Tier hatte schon eine Cystenhülle und ernährte sich nicht mehr; diese Vakuolen stehen also hier wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Ausscheidung von Material zur Bildung der Cystenwänden.

C. Entoplasma.

Ich will die Anwesenheit eines Gebildes im Entoplasma erwähnen, das bis jetzt nur von SCHNEIDER (44) beobachtet worden ist, dem er aber eine ganz andere Deutung als ich gibt.

Wenn man das Zusammenziehen der Pellicula bei *Op. ranarum* beobachtet, die wir später näher besprechen werden, kommt man zu der Überzeugung, daß irgendwelche Vorrichtung da sein muß, die Stützpunkte für die sich zusammenziehenden Teile bildet und die Erhaltung der blattähnlichen Form des Körpers ermöglicht. Ohne solche Vorrichtung müsse der Körper an den Stellen, wo sich die Pellicula auf der einen Seite zusammenzieht, an Dicke zu stark zunehmen. Solch ein Gerüst existiert bei *Op. ranarum* in Form eines Netzes aus zarten Stützfibrillen, die den ganzen Körper in allen Richtungen durchziehen. Dieses Netz ist deutlicher im Entoplasma zu sehen. Dort, wo die Pellicula nicht zusammengezogen ist, sind die Fäden des Netzes in allen Richtungen ungefähr gleichmäßig orientiert (Taf. 12 Fig. 5). An den Stellen aber, wo sich die Pellicula zusammenzieht, übt dieselbe eine ziehende Wirkung auch auf die Fäden aus und sie orientieren sich infolgedessen hauptsächlich in einer Richtung, die senkrecht zur Pellicula ist (Taf. 12 Fig. 6). Es geschieht dasselbe, was man beobachten kann, wenn man ein Stück Fischernetz mit beiden Händen nach zwei entgegengesetzten Richtungen zieht: das Netz verlängert sich, aber nur bis zu einem gewissen Grade, indem sich die Fäden fast parallel der Linie des Zuges einstellen. Hier haben wir ein Netz, das nur in einer Ebene liegt, bei *Op. ranarum* sind Netzfäden in mehreren Richtungen und Ebenen vorhanden.

Bei *Op. dimidiata* habe ich dasselbe Netz von Stützfibrillen wie bei *Op. ranarum* beobachtet, das sich durch den ganzen Körper verbreitet. Ich habe Stellen gesehen, wo sich dieses Netz im Ruhezustande fand, wie auch andere Stellen, wo es in einer Richtung gespannt wurde. Hier konnte ich auch die Verlängerung des Netzes im Ectoplasma verfolgen, wo es aus zarteren Fäden besteht (Taf. 12 Fig. 9).

Die Stützfibrillen des Ecto- und Entoplasmas sind dieselben, die SCHNEIDER (44) zum ersten Male und zwar bei *Op. ranarum* beobachtet hat; sie stellten das zuerst sicher nachgewiesene Gerüst bei den Infusorien dar. Keiner von den Autoren, die später Untersuchungen über Opalinen gemacht haben, hat diese Stützfibrillen erwähnt. Nach SCHNEIDER stehen die Stützfibrillen im Zusammenhang

mit den Basalkörnern der Cilien, und nur die Elementarfäden, in welche die Stützfibrillen übergehen, können „in Beziehung zu der eigenartigen Skulptur der Oberfläche zwischen den Cilienstreifen stehen“. Die direkte Verbindung zwischen den Stützfibrillen und den Basalkörnern der Cilien konnte ich nicht näher beobachten. Obwohl es gut möglich ist, daß das Gerüst im Ectoplasma mit den Basalkörnern in Berührung steht, schreibe ich den Stützfibrillen hauptsächlich eine andere Rolle zu. Die Stützfibrillen dienen dazu, die Körperform bei der verschiedenartigen Biegung durch die Myoneme zu erhalten; dafür spricht auch die Tatsache, daß man das Gerüst in gespanntem Zustande beobachten kann, wo die Stützfibrillen, infolge des Zuges, in einer Richtung eingestellt sind. Solche Spannung durch einen Zug der Cilien ist undenkbar. In den Dauerzysten der erwachsenen Opalinen, bei welchen also keine Spannung in irgendeiner Richtung vorhanden ist, findet man das Gerüst in ganz erschlafftem Zustande (Taf. 12 Fig. 10). Ferner muß ich bemerken, daß das Gerüst in keinem Zusammenhang mit den Macro- und Micronuclei steht. Die letzteren liegen im Entoplasma und sind nicht an dem Gerüst befestigt, wie SCHNEIDER anzunehmen geneigt ist.

Bewegungen der Opalinen.

Über die Bewegungen der Opalinen finden wir in der Literatur sehr wenige Angaben. WALLENGREN (53) gibt an, daß *Op. ranarum* beim Schwimmen sich rechts herumdreht. Diese drehende Bewegung erklärt er nur aus der Tätigkeit der Cilien, die nach seiner Meinung in verschiedenen Körperteilen in verschiedener Richtung schlagen. Wenn man muntere Tiere beobachtet, erkennt man leicht, daß diese Erklärung der Wirklichkeit nicht ganz entspricht. *Op. ranarum* dreht sich beim Schwimmen nach beiden Seiden herum: sie schwimmt eine Zeitlang, indem sie sich spiralig rechts herumdreht; dann hält sie für einen Moment an und setzt die Bewegung fort, indem sie sich jetzt linksherum dreht. Diese Änderung der Drehrichtung erfolgt hauptsächlich nicht durch eine Änderung der Cilientätigkeit, sondern durch eine rasche Formumwandlung. Der blattförmige Körper von *Op. ranarum* bleibt nicht eben, sondern biegt sich vielfach und zwar auf eine ganz bestimmte Weise bei jeder Richtungsänderung. Wenn das Tier sich rechtsherum dreht, ist die vordere Hälfte des linken Randes nach oben, die des rechten nach unten gebogen. Die hinteren Hälften der Ränder sind dabei in entgegengesetzter Richtung gebogen, wenn auch nicht so stark, wie die

vorderen. Wenn das Tier die Drehrichtung wechselt, sieht man wie alle diese vier Ränderteile sich in einem Moment gleichzeitig in umgekehrter Richtung umbiegen und in dieser Stellung verharren, bis die Drehrichtung sich von neuem ändern soll. Diese gebogenen Körperteile dienen also als eine Steuervorrichtung.

Die Biegung der einzelnen Körperteile erfolgt durch Zusammenziehen der betreffenden Teile der Pellicula. Es müssen also Organellen (Myoneme) bestehen, die das ermöglichen. Diese Myoneme müssen so beschaffen sein, daß sie sich nur in einzelnen Abschnitten der Pellicula, und zwar in verschiedenem Grade zusammenziehen können.

Die zylindrischen Opalinaarten, wie die *Op. dimidiata* und *Op. intestinalis* drehen sich beim Schwimmen auch nach beiden Richtungen. Als Steuervorrichtungen können hier steife Längsleisten dienen, die schräg vom vorderen zum hinteren Ende verlaufen, und die in einem Momente verschwinden. Gleich darauf bilden sich ähnliche Leisten, aber in entgegengesetzter Richtung. Das Vorderende ist dabei immer nach einer Seite etwas gekrümmt.

Kerne und Kernsubstanzen.

A. Micronuclei. Chromidienbildung.

Die Micronuclei der Opalinen wurden anfangs nur als „Kerne“ bezeichnet, ohne Andeutung, ob sie den Macro- oder den Micronuclei entsprechen. BÜTSCHLI (3, p. 1500), war der erste, der sie richtig als Micronuclei erkannte, weil sie sich „vollkommen nach der Art der Micronuclei auf ausgesprochenem indirektem Weg“ teilen. In bezug auf die Macronuclei schreibt er: „Es scheint auch sicher, daß eine zweite (Sorte von Kernen) nicht existiert.“ PARKER und HASWELL (41, p. 84) sind auch der Meinung, daß die Opalinenkerne den Micronucleen ähneln, weil sie sich durch Mitose teilen; diese Autoren unterscheiden die Opalinen von den anderen Ciliaten nach der vollkommenen Abwesenheit von Macronuclei. HICKSON (16) hält die Micronuclei für Macronuclei und behauptet irrtümlich, daß sie sich hauptsächlich amitotisch teilen (vielleicht handelt es sich um die amitotische Teilung der echten Macronuclei?). LÖWENTHAL, der über *Op. ranarum* gearbeitet hat, hält die Micronuclei gleichzeitig für Micro- und Macronuclei. Er behauptet, daß der Kern nur während der Zeit der Bildung von Infektionssystem Chromidien ausscheidet, die dem Micronucleus entsprechen, „der bei dem in der Folgezeit vorauszusetzenden Geschlechtsgang in Funktion zu treten hätte“; der Rest von Nucleus, der seine färbbare Substanz gänzlich verliert,

soll nach LÖWENTHAL als Macronucleus angesehen werden. NERESHEIMER, der wie LÖWENTHAL hauptsächlich über *Op. ranarum* gearbeitet hat, findet die Chromidien wieder nur in der Periode der Geschlechtsfortpflanzung. Während dieser Zeit unterscheidet er zwei Arten von Chromidien und zwar: Somatochromidien, die wahrscheinlich unter Pigmentbildung zugrunde gehen, und Sporetien oder Gametochromidien, die die Geschlechtskerne zu bilden haben. Eine Anzahl von Kernen (d. h. von Micronuclei nach meiner Auffassung) beteiligen sich nicht am Prozesse der Chromidienbildung und bleiben als Reservekerne, die dem vegetativen Leben der Zelle weiter dienen. Diese Reservekerne, wie auch die von den Sporetien befreiten Prinzipalkerne sind nach NERESHEIMER als Äquivalent des Macronucleus. Die Sporetien lagern sich in besondere Gebilde (Alveolen) hinein, die im Protoplasma auftreten. Diese Alveolen sind wahrscheinlich ein und dieselben Gebilde, wie die vergrößerten „scheibenförmigen Körperchen“ von ZELLER, die nach ihrem Wachstum in einem späteren Stadium verschwinden. Die in den Alveolen eingelagerten Sporetien bilden die Geschlechtskerne, die heranwachsen und sich an den weiteren Prozessen der Geschlechtsvermehrung beteiligen. Kurz gefaßt hält NERESHEIMER einen Teil der echten Micronuclei der Opalinen vor der Periode der Geschlechtsprozesse für gleichwertig den Macronuclei, den größten Teil für ebensolche, die aber auch generative Substanz enthalten, die bei der Geschlechtsvermehrung in Form von Chromidien austritt und generative Kerne bilden. METCALF (35), der überhaupt über *Op. intestinalis* gearbeitet hat, hält die Micronuclei für ein Äquivalent der Macro- und Micronuclei zusammen. Chromidienausscheidung hat er nicht nur während der Zeit der Geschlechtsvermehrung, sondern auch im Herbst (p. 244) beobachtet. Er ist mit NERESHEIMER darüber nicht einverstanden, daß es bei den Opalinen generative Chromidien gibt, und daß die Kerne nach der Chromidienausscheidung zugrunde gehen. Die Chromidien treten nach METCALF wahrscheinlich größtenteils in gelöstem Zustande durch die Kernwand heraus und stehen vielleicht mit der Bildung der „scheibenförmigen Körperchen“ von ZELLER in Zusammenhang.

Mit der Klärung der Natur dieser „scheibenförmigen Körperchen“, die die Macronuclei darstellen, wie wir im nächsten Kapitel sehen werden, klärt sich auch die Natur anderer Organellen. Die bis jetzt nur als „Kerne“ bezeichneten Gebilde sind die Micronuclei der Opalinen, weil sie sich mitotisch teilen und die Gametenkerne bei den Geschlechtsvorgängen bilden. Es klärt sich auch die Natur der aus ihnen austretenden stark färbbaren Substanzen, die gewöhnlich

Chromidien genannt werden. Ich behalte auch den Ausdruck „Chromidien“, bei, ohne damit eine bestimmte theoretische Auffassung dieser Gebilde zu verbinden.

In der ganzen Zeit von Ende November bis zur Zeit der Geschlechtsvermehrung habe ich die Chromidienausscheidung bei *Op. ranarum* beobachtet. Sie ist also kein Prozeß, der nur mit der Geschlechtsvermehrung verknüpft ist, wie NERESHEIMER und LÖWENTHAL glaubten. Chromidienbildung habe ich bei ruhenden Kernen wie auch bei in Teilung begriffenen gesehen (Taf. 12 Fig. 21, die nach Präparaten von *Op. ranarum* gezeichnet ist, die am 28. November fixiert wurden). Chromidienbildung konnte ich auch bei den Gametocyten von *Op. ranarum* feststellen (Taf. 12 Fig. 30 a). Die Chromidienbildung ist also auch bei den Opalinen ein Prozeß, der in allen Stadien des Lebens des Kernes stattfinden kann, und sich in Zusammenhang mit der physiologischen Tätigkeit der Kerne befindet.

Was den Vorgang des Austretens der Chromidien aus den Micro-nuclei betrifft, so kann ich die Meinung von METCALF insofern unterstützen, als die Chromidien sich gewöhnlich wahrscheinlich vor dem Austritt aus dem Kerne auflösen und in solchem Zustande den Kern verlassen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sehr oft die an der Wand des Kernes befindlichen Chromidien in einer Zone von heller Flüssigkeit liegen (Taf. 12 Fig. 20, 23). Ich habe aber, wenn auch selten, Fälle beobachtet, wo die Chromidien noch in festem Zustande den Kern verließen und kurz darauf in Protoplasma zerfielen (Taf. 12 Fig. 21, 22, 23). Die Masse von vegetativem Chromidien dringt an einer Stelle durch die Kernwand hinaus, gelangt in das Protoplasma, wo sie freiliegt. Diese unregelmäßigen Chromidienstückchen im Protoplasma zeigen aber deutlich durch ihr Aussehen, daß sie sich in einem Zustande der Auflösung befinden.

Die Chromidien bei den Opalinen geben keinen neuen Kernen den Ursprung. Die „generativen Kerne“, die NERESHEIMER beobachtet hat, sind auf eine andere Weise zu erklären. Wenn man einen Blick auf seine Fig. 7, 9, 10 (Taf. II) wirft, so bekommt man sofort den Eindruck, daß die „plasmatischen Kugeln“, in die sich die Sporetien einlagern sollen, nichts anderes darstellen als die Macronuclei selbst. Wie ich das oft bei *Op. ranarum* beobachtet habe, färben sich die Macronuclei manchmal ziemlich stark, manchmal sehr schwach, wobei ganz nahe beieinander liegende Macronuclei verschieden stark gefärbt werden können. Ich glaube, daß NERESHEIMER die stark gefärbten Macronuclei für junge generative Kerne gehalten hat, die blassen für „plasmatische Kugeln“, die leergeblieben

sind und nach seiner Meinung später verschwinden sollen. NERESHEIMER (p. 14 u. 15) erwähnt, daß ein Teil der „scheibenförmigen Körperchen“ (d. h. die Macronuclei) an Größe erheblich zunimmt und ferner sagt er: „Ich habe nur die Vermutung, daß die vergrößerten Scheiben und die plasmatischen Kugeln oder Alveolen ein und dieselben Gebilde sind“ (p. 15). Mit anderen Worten sind die generativen Kerne umgeänderte scheibenförmige Körperchen, d. h. Macronuclei. Daß NERESHEIMER „generative Kerne in Wachstum“, d. h. etwas größer als gewöhnlich beschreibt, ist auch leicht zu erklären. Ich habe festgestellt, daß bei *Op. ranarum* Macronuclei vorkommen, die bedeutend größer oder auch viel kleiner als die gewöhnliche Norm sind und alle können sogar in den Prozeß der Teilung treten (Taf. 12 Fig. 19 a, b). Andererseits sind unter den Micronucleen auch solche zu finden, die kaum mehr als die Hälfte der gewöhnlichen messen. Diese größeren Macro- und kleineren Micronuclei sind vielleicht von NERESHEIMER als Wachstumsstadien seiner generativen Kerne betrachtet worden.

B. Macronuclei.

Ursprünglich wurden die Opalinen von STEIN (46) als Infusorien bezeichnet, die sich von den übrigen Ciliaten durch den Mangel an Kernen unterschieden. Später erkannte derselbe Autor (47) auch ihnen die Anwesenheit kernartiger Gebilde an. Echte Kerne wurden bei den Opalinen erst von KÖLLIKER aufgewiesen (19). In seiner wertvollen Arbeit bezeichnet ZELLER (54) in *Op. ranarum* neben den zahlreichen „bläschenförmigen Kernen“ noch die „eigentümlichen scheibenförmigen Körperchen“, die ich für Macronuclei halte. Die Organellen, die von den meisten Autoren nur als Kerne bezeichnet werden, entsprechen den Micronuclei der übrigen Ciliaten und deshalb werde ich sie als Micronuclei auch bezeichnen.

Die „scheibenförmigen Körperchen“ hat ZELLER schwach abgeplattet, mit mattem Glanz und in einer Größe von durchschnittlich $4\ \mu$ gesehen. Dieselben Körperchen entdeckte er auch bei *Op. obtrigona*, *Op. dimidiata* und *Op. caudata*. Nur bei *Op. similis (intestinalis)* erwähnt er sie nicht. Wahrscheinlich waren sie bei den von ihm beobachteten Exemplaren in vivo nicht sichtbar, was, wie wir später sehen werden, oft vorkommen kann. Um die Natur der Macronuclei wurde viel gestritten. PFITZNER (42, p. 455) hielt sie zuerst für parasitische Algen. Sehr wichtige Beobachtungen machte TÖNNIGES (p. 130). „Diese Körner“, schreibt er, „haben zumeist eine scheibenförmige Gestalt, welche jedoch stark wechseln kann, so daß

wir die verschiedensten Formen unter ihnen antreffen. Sie können in der Regel gestreckt sein, so können unregelmäßige Formen zeigen und endlich Figuren, wie sie durch Teilungen hervorgerufen werden.“ Und ferner: „Die Teilung ist eine direkte, indem das betreffende Körnchen eine länglich-ovale Gestalt annimmt, welche allmählich in eine Hantelfigur übergeht und schließlich zwei Teilprodukte, die noch längere Zeit mittels eines feinen Verbindungsfadens in Zusammenhang bleiben, entstehen läßt. Diese Teilungen, welche sehr gut zu beobachten waren, sind sehr häufig und es ist hervorzuheben, daß sie bei ihrem Eintreten, die größte Menge der Kernchen einer Opalina in Mitleidenschaft ziehen“ (p. 131). Dies alles kann ich nur als vollkommen richtig bestätigen. Leider hat TÖNNIGES keine Abbildungen der Teilungsmomente von Macronuclei beigegeben, und die Autoren, die später Untersuchungen über die Opalinen gemacht haben, hielten alles für eine irrtümliche Beobachtung (METCALF p. 323). TÖNNIGES zog auch keinen entscheidenden Schluß aus seinen richtigen Befunden. Er sagt: „Die Bedeutung der Körner ist vorläufig vollständig unklar. Daß sie keine Excretkörner sein können, beweisen nicht nur die mikrochemischen Reaktionen, sondern auch in erster Linie ihre Teilungen, welche diese Annahme vollständig ausschließen. Ob sie als parasitäre Organismen oder vielleicht als der in kleine Teilstückchen aufgelöste Macronucleus zu betrachten sind, müssen kommende Untersuchungen lehren“ (p. 132). Auch KUNSTLER und GINESTE (20) schreiben diesen Gebilden Individualität zu, weil sie ebenfalls die Vermehrung derselben gesehen haben. Die Richtigkeit ihrer Beobachtung wurde später auch bestritten (METCALF, 35, p. 332). HICKSON (16) stellt auf, daß die Opalinen sowohl Macro- wie auch Micronuclei besitzen, weil die kleineren Gebilde, die neben den gewöhnlichen Kernen in den Opalinen vorkommen, auch Chromatin enthalten. Er hält sie aber für Micronuclei und die richtigen Micronuclei für Macronuclei. FAURÉ-FREMIET (12) betont, daß die „Vesicles“ im Entoplasma (d. h. die Macronuclei) weder für Reservahrung noch für Excretionsteilchen gehalten werden dürfen. Später schließt sich auch dieser Autor der Meinung von KUNSTLER und GINESTE an, indem er diese Gebilde als Zellorganellen und zwar als Excretionsorganellen betrachtet. METCALF (35) studierte eingehend die Macronuclei, die er als „endosarc spherules“ bezeichnet. Er stellt auf, daß diese „spherules“ keine Öltropfen, kein Lecithin darstellen, daß sie vielleicht ähnlicher Natur wie die „endosarc spherules“ bei *Nyctoteres* und *Balanditium* sind, die Paraglykogen enthalten, aber doch Unterschiede in den chemischen Reaktionen zeigen; er

stimmt mit TÖNNIGES überein, indem er nicht geneigt ist, diese „spherules“ als Parasiten oder Excretionsteilchen zu bezeichnen. Er hält aber die Beobachtung von TÖNNIGES über die Teilung derselben für unrichtig, weil er trotz langen Suchens keine Teilungsmomente gefunden hat und weil die „endosarc spherules“ sich mit Neutralrot und anderen Farben *intra vitam* färben, was nach seiner Meinung gegen die Annahme der Individualität dieser Gebilde spricht.¹⁾ Er ist der Meinung, daß die „endosarc spherules“ Reserve-material darstellen und bei ihrer Entstehung sich wahrscheinlich die Chromidien beteiligen. Andererseits aber besteht METCALF zu, (p. 218, 219), daß das Endoplasma Nahrungssubstanz in flüssiger Form enthält, die reichlich bei frisch aus dem Froschdarm herausgenommenen Opalinen ist, spärlich bei hungernden Individuen, deren „endosarc spherules“ aber sich nach 48stündigem Hunger genau so färben wie bei den nicht ausgehungerten Opalinen. Schon diese beiden Tatsachen widersprechen dem Standpunkt von METCALF.

Die Frage nach der Natur der „endosarc spherules“ hielt ich für sehr wichtig und schenkte ihr viel Aufmerksamkeit, weil die richtige Deutung dieser Gebilde uns mehrere andere Fragen klar machen kann, so z. B. die Frage nach der Natur der Opalinenkerne und der Ectoplasmavakuolen, die Frage nach dem Schicksal der Chromidien, sowie die nach der systematischen Stellung der Opalinen.

Die scheibenförmigen Körperchen von ZELLER kommen nicht immer in einer und derselben Form vor, wie sie von manchen Autoren beschrieben worden sind, sondern man kann sie in ziemlich verschiedener Gestalt beobachten: sie können scheibenförmig, etwas länglich oder sehr verlängert, auch in der Mitte eingeschnürt sein (Taf. 13 Fig. 2), stets aber haben sie eine deutliche Membran. Das Aussehen *in vivo* ist sehr verschieden: gewöhnlich sind sie stärker lichtbrechend als das Protoplasma und werden deshalb gewöhnlich deutlich erkannt. Der Grad aber dieser Deutlichkeit ist auch verschieden. In Kulturen von *Op. ranarum*, die ich mit Eiweiß (im Dezember) fütterte, fand ich sie mit ungewöhnlich starkem Glanz (Taf. 13 Fig. 1). Bei Kulturen von derselben Opalineart, die 3 Tage in reiner PÜTTER'scher Flüssigkeit gehalten wurden, in welchen sich also keine Ernährungsprozesse abspielten, verloren sie umgekehrt ihr gewöhnliches Aussehen und waren im lebenden Tier nicht mehr zu erkennen (Taf. 13 Fig. 3). Das Entoplasma solcher Opalinen ist stark mit lichtbrechenden Kristallen gefüllt, die sonst sehr

¹⁾ In seiner vorläufigen Mitteilung aber (34, p 113) hielt er diese Teilung für wahrscheinlich.

spärlich oder sogar gar nicht vorhanden sind. Es sind die Körperchen, die schon ZELLER beobachtet hat. Auf fixierten und gefärbten Präparaten von solchen ausgehungerten Opalinen aber ließen sich die „scheibenförmigen Körperchen“ genau so färben, wie bei Tieren, die nicht gehungert hatten. Bei gelungener Differenzierung sieht man im Innern der „scheibenförmigen Körperchen“ mehrere dunkle Flecken (Taf. 12 Fig. 21, 22).

Die Tiere der Hungerkulturen starben meistens am vierten Tag. Am dritten Tag (im Dezember) befinden sich die Tiere in einem Zustande der äußersten Erschöpfung. Die Tatsache, daß auch dann die „scheibenförmigen Körperchen“ da sind und sich auf dieselbe Weise färben wie gewöhnlich, zeigt uns, daß sie keine Reservestoffe sind. Wie auch METCALF (p. 218, 219) bemerkt, sind die Reservestoffe der Opalinen im Entoplasma aufgelöst, und deshalb weist es bei ausgehungerten Tieren nicht mehr die Reaktionen auf, die die Anwesenheit derselben Stoff in Normaltieren beweisen.

Von einer Excretionsfunktion kann auch keine Rede sein, da die Opalinen dazu ein spezielles Organell besitzen. METCALF hat bei den cylindrischen Opalinen solches mit Sicherheit festgestellt, wie auch Spuren von einem solchen Organell bei *Op. obtrigona*; mir gelang es, ein solches auch bei *Op. ranarum* festzustellen, wovon später die Rede sein wird. Die „scheibenförmigen Körperchen“ müssen also als Organellen anderer Art betrachtet werden. Wenn sie Macronuclei darstellen, muß man ganz deutlich, sicher und oft ihre Teilung beobachten können; eine solche Teilung aber wurde von den meisten Autoren bestritten.

Nachdem ich verschiedene Färbungsmethoden benutzt hatte, konnte ich einwandfrei Teilungsmomente von Macronuclei in Präparaten von *Op. ranarum* beobachten, die mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt worden waren, ohne daß die Farbe differenziert wurde. Die Verbindungsfäden zwischen beiden Stücken waren ganz deutlich, aber mehr als diese Fäden war in der Teilungsfigur bei einer solchen Färbung nicht zu sehen. Bei der Differenzierung entfärbt sich zuerst der Verbindungsfaden und darin liegt die Erklärung dafür, warum den meisten Autoren dieses Teilungsmoment entgangen ist. Bessere Färbung bekam ich mit alkoholischem Hämatoxylin nach DOFLEIN, wobei ich die Farbe außerordentlich verdünnte und progressiv färbte. Die besten Resultate gab mir die Färbung auf die letztgenannte Weise bei Nachfärbung mit alkoholischem Eosin.

Der Macronucleus teilt sich so wie bei den anderen Ciliaten. Er verlängert sich, schnürt sich in der Mitte immer mehr und mehr

ein, das Zwischenstück zwischen den beiden Hälften verdünnt sich immer weiter, ist schließlich nur als dünner Faden zu sehen und reißt dann ab (Taf. 12 Fig. 16, 17). Anfangs ist an einem Ende der Tochterkerne noch ein Rest dieses Fadens sichtbar (Taf. 12 Fig. 18a, b). Kurz nach der Teilung haben die Tochterkerne eine ziemlich unregelmäßige Form, oder sie sehen verlängert aus (Taf. 12 Fig. 18c). Später bekommen sie ihre Discoidalform, die dem Ruhezustand entspricht (Taf. 12 Fig. 18d).

Wenn man bei gelungener Differenzierung die Teilung näher verfolgt, sieht man, daß die Kernmembran anfangs ein Rohr darstellt, das in der Mitte bald ganz leer wird, da sich die Kernsubstanz gegen beide Pole zurückzieht. Diese Kernsubstanzmassen färben sich dunkel, das Verbindungsrohr, das später zum Verbindungsfaden zusammenfällt, sehr blaß (Taf. 12 Fig. 16, 17).

Es ist bemerkenswert, daß man Individuen findet, bei welchen die meisten Macronuclei in Teilung begriffen sind, und daß man in jedem Schnitt viele Dutzende von Teilungsmomenten nachweisen kann. In anderen Individuen trifft man nur wenige, bei wieder anderen fast keine solchen Momente. Das zeigt, daß von Zeit zu Zeit die Tiere in einen Zustand geraten, wo die Teilung der Macronuclei massenhaft eintritt. Dasselbe habe ich auch bei der Teilung der Macronuclei beobachtet, obwohl in viel geringerem Maße. Die sich teilenden Macronuclei kann man auch *in vivo* erkennen, wenigstens in den Anfangsstadien, wenn sie massenhaft eintreten. Bei solchen Individuen sind fast alle Macronuclei etwas länglich, in der Mitte etwas eingeschnürt, oft etwas gekrümmt und immer stark lichtbrechend (Taf. 13 Fig. 2).

Gegen die Färbung *intra vitam* verhalten sich die Macronuclei nicht gleich. Bei *Op. ranarum*, *Op. dimidiata* und *Op. intestinalis* lassen sie sich bei schwachen Lösungen von Neutralrot nicht färben. Ich habe *Op. ranarum* in solcher Lösung bis 6 Stunden gehalten: das Protoplasma wurde stark gefärbt, die Macronuclei aber nicht. Mit GENTIAN-Violett färben sich die Macronuclei von *Op. ranarum* sofort, nach kurzer Zeit aber beim noch lebendigen Tiere färben sich auch die Micronuclei. Genau so verhalten sich die Macronuclei bei *Op. dimidiata*. Bei *Op. intestinalis* färben sich mit Neutralrot die Macronuclei wieder nicht, was am deutlichsten am Hinterrande des Körpers zu sehen ist, wo sie vom gefärbten Protoplasma weniger maskiert sind. Bei dieser Art werden umgekehrt die Micronuclei, besonders wenn sie Chromidien enthalten, vom Neutralrot stark gefärbt. Gegen GENTIAN-Violett verhalten sich die

Macro- und Micronuclei von *Op. intestinalis* und *Op. caudata* genau so wie bei den anderen Opalinaarten.

Die Gebilde, die ich als Macronuclei bezeichne, finden sich ausnahmslos bei allen Opalinaarten. An fixierten Präparaten färben sie sich wie Macronuclei, haben wie diese eine deutliche Membran. Bei lebendigen Opalinen ändern sie ihr Aussehen je nach dem physiologischen Zustande des Tieres. Sie teilen sich wie die Macronuclei der übrigen Ciliaten. Die Färbung *intra vitam* mit manchen Farben kann nicht als Argument gegen die Auffassung benutzt werden, daß sie wirklich Macronuclei sind, weil sich mit GENTIAN-Violett, wenn auch etwas schwerer, auch die Micronuclei der Opalinen färben. Der Macronucleus von *Balantidium* färbt sich mit GENTIAN-Violett genau so wie die der Opalinen. Bei manchen anderen Ciliaten ist auch Vitalfärbung des Macronucleus gelungen, aber auch offenbar nur bei bestimmten physiologischen Zuständen. Mit Neutralrot färben sich die Micronuclei bei *Op. intestinalis* früher als die Macronuclei. Jedenfalls muß ich bemerken, daß meine Resultate über die Vitalfärbung mit denen von METCALF nicht ganz übereinstimmen, weil er behauptet (p. 346), daß sich die „endosarc spherules“ von *Op. intestinalis* mit Neutralrot „dark red“ und die Nuclei (d. h. die Micronuclei) gar nicht färben. Vielleicht spielt hier auch der physiologische Zustand des Tieres eine gewisse Rolle.

Von großer Bedeutung für das Wesen dieser Gebilde ist ihr Verhalten während der Geschlechtsvermehrung. Diese werde ich ausführlicher an anderer Stelle besprechen. Hier will ich nur daran erinnern, daß in den Infektionscysten die Macronuclei genau so gebildet sind, wie in den erwachsenen Tieren. Ein Hauptmerkmal ist die Anwesenheit einer Membran, die ihnen die charakteristische Form *in vivo* wie auch bei der Färbung mit Vitalfarben oder bei der Färbung nach Fixierung immer erhält. Bei den Gametocyten findet man anstatt gutgeformter Macronuclei nur Tropfen oder membranlose Stäbchen von ähnlicher lichtbrechender Substanz (Taf. 12 Fig. 30 b, c). Bei Versuch, sie *in vivo* zu färben, zerfallen die Stäbchen in einigen Sekunden auch in einzelne Tropfen (Taf. 12 Fig. 30 d, e). Bei fixierten und gefärbten Gameten und Zygoten ist von den Macronuclei keine Spur mehr zu sehen (Taf. 12 Fig. 27, 28, 29, 30 c, g). Die Macronuclei der Opalinen also degenerieren während der Gametenbildung. Das ist ein weiterer Beweis dafür, daß wir es hier mit Macronuclei zu tun haben, die sich bei den Geschlechtsgvorgängen genau so verhalten wie die Macronuclei der übrigen Ciliaten.

Ernährung der Opalinen.

Die Angaben von KÜNSTLER und GINESTE (25, p. 294), daß die Opalinen einen Mund und After besitzen, sind von keinen anderen Autoren bestätigt worden. Mund und After habe ich auch bei den Opalinen nicht gefunden. Sie ernähren sich also osmotisch. Die Kulturen, die ich mehr als einen Monat mit abgekochter und stark zentrifugierter Flüssigkeit von der Durchspülung des Froschdarmes fütterte, beweisen, daß diese Tiere ihr Nahrungsmaterial in flüssiger Form von der Umgebung beziehen können. Die feinen fadenförmigen Stränge, die von der Pellicula durch das Ectoplasma ziehen, bis zum Entoplasma gelangen und dort verschwinden, sind eben die nahrungshaltigen Flüssigkeiten, die durch die Pellicula osmotisch durchdrungen sind (Taf. 12 Fig. 11).

Eine zweite Frage in Zusammenhang mit der Ernährung der Opalinen hat sich mit den Versuchen von PÜTTER ergeben und zwar die, ob die Opalinen auf irgendwelche Weise auch feste Nahrungsteilchen ausnutzen können. Mit *Op. ranarum*, mit welcher er in der Zeit vom Oktober bis zum 1. März gearbeitet hat, also nicht in der Zeit direkt vor der Geschlechtsvermehrung, machte er folgende Versuche. Er ließ die Opalinen in seiner Kultivierungsflüssigkeit hungern: am dritten Tag fingen sie zu sterben an, die letzten Exemplare starben am 7. Tag. Zu anderen Kulturen setzte er Eiweißpulver: die Opalinen lebten 13, manche Exemplare sogar 20 Tage. Aus diesen Versuchen von PÜTTER geht hervor, daß die Opalinen das Eiweiß extracellulär verdaut und danach die Spaltungsprodukte osmotisch aufgenommen haben. Es bestehen keine anderen Versuche über diese Frage. METCALF (35, p. 340) zweifelt daran, daß die Verdauung bei den Versuchen von PÜTTER einer extracellulären Wirkung der Opalinen zuzuschreiben ist; er neigt vielmehr dazu anzunehmen, daß hier die Bakterien die Verdauung bewirkt haben.

Über diese so interessante Frage stellte ich auch Versuche an. Ich habe zuerst einigemal 10 Hungerkulturen von *Op. ranarum* angesetzt, wobei die ausgekochte PÜTTER'sche Flüssigkeit jeden Tag gewechselt wurde. Die Tiere in den am 21. Dezember 1920 angesetzten Kulturen waren schon am 23. kaum beweglich, am 24. teilweise gestorben, am 25. alle tot. Hungerausdauer 4—5 Tage. Hungerkultur von *Op. dimidiata* angesetzt am 24. Dezember 1920. Am 26. die Tiere schon schwach beweglich; am 29. unbeweglich, teilweise gestorben; am 30. die ganze Kultur gestorben. Hungerausdauer 5—7 Tage. Hungerkultur von *Op. ranarum*, angesetzt am 24. Dezember 1920.

Am 26. erschienen schon viele Abnormitäten mit Auswüchsen; am 27. sind die Tiere schwach beweglich; am 28. ist die Kultur schon gestorben. Hungerausdauer 4—5 Tage.

Die Resultate der obigen Versuche stimmen mit denselben von PÜTTER vollkommen überein. Jetzt wollte ich die Ernährungsversuche mit festen Nahrungsteilchen wiederholen, aber unter Ausschaltung der Bakterienwirkung. Eine Entfernung der Bakterien selbst bei solchen Versuchen ist undenkbar, deshalb versuchte ich die Möglichkeit einer Verdauung durch sie auszuschalten. Die Kulturen von *Op. ranarum* durchspülte ich jeden Tag einigemal nach kurzem Zentrifugieren mit frisch aufgekochter und abgekühlter Flüssigkeit. Steril aufbewahrtes, abgekochtes Eiweiß wurde dann mit Glaspulver feinst zerrieben, mit frisch ausgekochter Flüssigkeit verdünnt und sehr stark zentrifugiert. Von der Flüssigkeit, deren feinste Eiweißteilchen sich auch bei solchem Zentrifugieren nicht setzten, gab ich den Kulturen zu. Nach 2½ Stunden spülte ich die Kulturen wiederum einigemal durch, damit jede Spur vom Eiweiß entfernt wurde. Auf diese Weise konnten die Kultur und die Nahrung nicht so viel Bakterien enthalten, daß sie imstande wären, eine Spaltung des Eiweißes herbeizuführen; in 2½ Stunden könnten sie sich auch nicht stark genug vermehren, um die Verdauung zu verursachen, diese Zeit aber genügte zur Verdauung des Eiweißes, wenn die Opalinen wirklich imstande sein sollten, extracellulär zu verdauen. Die Kultur war am 6. Januar angesetzt; zur Kontrolle wurde auch eine Hungerkultur geführt. Am 9. waren die Opalinen der Kontrollkultur schwach beweglich, am 10. schon gestorben. Die auf die obige Weise gefütterte Kultur war in dieser Zeit ganz normal und am 11. wurde sie vernichtet.

Die Anwesenheit von festen Eiweißpartikelchen in der Flüssigkeit scheint einen Reiz auf die Opalinen zu üben. Gewöhnlich liegen die Opalinen in einem Haufen am Boden des Glases, wo sie nur sehr schwache Bewegungen ausführen. Wenn man die Flüssigkeit wechselt, kommen die Tiere nur für kurze Zeit in Erregung, schwimmen in der Flüssigkeit herum, nach einigen Minuten aber beruhigen sie sich und bleiben wieder am Boden liegen. Wenn man aber nicht nur die Flüssigkeit wechselt, sondern auch etwas frisches, ausgekochtes, steriles und pulverisiertes Eiweiß hineinsetzt, beobachtet man stundenlang ein sehr lebhaftes Schwimmen, wobei die Tiere auch ziemlich weit nach oben emporsteigen.

Alle Kulturversuche, die ich mit Opalinen gemacht habe, lassen mich glauben, daß diese Infusorien tatsächlich auch feste Eiweiß-

partikelchen, die in der sie umgebenden Flüssigkeit liegen, auf irgendwelche Weise ausnutzen können.

Excretion der Opalinen.

A. Excretionskörperchen.

Bei der Beschreibung des Protoplasmas von *Op. ranarum* erwähnt ZELLER (52, p. 355) die Anwesenheit „einer außerordentlichen Menge ganz kleiner glänzender Kügelchen“, die neben dem „eigenthümlichen scheibenförmigen Körperchen“ (d. h. den Macronuclei) zu finden sind. Sie wurden von den späteren Forschern nicht beobachtet.

Solche glänzende Kügelchen und öfters glänzende winzige Kristalle habe ich vielmals bei *Op. ranarum* wie auch bei *Op. dimidiata* gefunden. In Analogie mit ähnlichen Gebilden bei anderen Infusorien halte ich sie für Excretionskörperchen. In Opalinen, die direkt aus dem Froschdarm herausgenommen sind, kommen sie verhältnismäßig sehr selten vor. So erkläre ich mir die Tatsache, daß sie den meisten Autoren entgangen sind. Wenn aber die Lebensbedingungen für die Tiere etwas ungünstig werden, erscheinen sie unvermeidlich in großer Menge. Sie treten dann massenhaft bei Tieren auf, die 2—3 Tage ohne Nahrung gehalten werden (Taf. 13 Fig. 3, 4). Sie haben gewöhnlich die Form kleiner Kristalle verschiedener Größe; gegen den Rand des Tieres zu sind sie sehr klein, gegen die Mitte ungefähr doppelt so groß. Ihre Größe beträgt gewöhnlich bis 3μ . Sie sind stark lichtbrechend, ihre Ränder erscheinen dunkel und wenn sie dicht angehäuft sind, geben sie auch dem Entoplasma ein dunkles Aussehen. Sie erfüllen, wenn massenhaft vorhanden, das ganze Entoplasma und verdecken die Macro- und Micronuclei, die in diesem Fall schwer oder gar nicht sichtbar sind. Bei Opalinen, die in Kulturen gut ernährt werden, erscheinen die Excretionskörperchen in Form winziger Kügelchen oder Kristalle, die in nicht großer Menge zwischen die Macro- und Micronuclei verstreut sind (Taf. 13 Fig. 1, 2). Sehr oft aber sind sie überhaupt nicht zu sehen.

In ganz großen Mengen treten die Excretionskörperchen in erwachsenen Opalinen auf, die im Begriff sind, sich zu encystieren. Die *Op. dimidiata* im Darm gestorbener Frösche, die noch herumschwammen, aber sich bald encystieren sollten, sahen von Excretionskörperchen ganz schwarz aus (Taf. 13 Fig. 8). Dasselbe Aussehen hatten auch die Tiere, die schon ganz encystiert waren. Auch bei

Opalinen in den Kulturen, bei welchen es zur Encystierung kam, war dasselbe zu beobachten. Anfangs erscheinen die Excretionskörperchen in der Mitte, breiten sich allmählich aus und füllen endlich die ganze Cyste an (Taf. 13 Fig. 5—7). Die übermäßige Anhäufung dieser Produkte in den Cysten steht wahrscheinlich mit der verminderten Tätigkeit des Excretionsorganells in Zusammenhang.

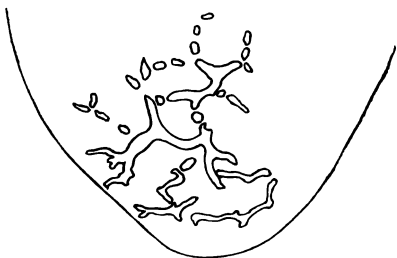
Ähnlich wie bei *Op. dimidiata* treten die Excretionsteilchen auch bei den encystierten *Op. ranarum* massenhaft auf. Das ganze Entoplasma wird sehr dunkel und von den Macro- und den Micro-nuclei ist nichts mehr zu sehen (Textfig. 6).

Bei der Gametenbildung habe ich auch Fälle beobachtet (Taf. 13 Fig. 15d) wo die Excretionskörperchen in ziemlich großen Mengen in der hinteren Hälfte des Körpers auftraten.

B. Excretionskanäle.

Zum erstenmal wurden solche bei den Opalinen mit Sicherheit von METCALF (33, 35) bei *Op. intestinalis*, *Op. caudata* und *Op. obtrigona* festgestellt. Derselbe hat auch bei den jungen Frühlingsopalinen in den Kaulquappen, wie auch bei den Macrogameten von *Op. intestinalis*, *Op. caudata* und *Op. dimidiata* beobachtet. In allen diesen Fällen besteht das Excretionsorganell aus mehreren Vakuolen, die gewöhnlich zusammenfließen. Bei den flachen Opalinaarten hat METCALF Spuren von einem Excretionsorganell nur bei *Op. obtrigona* gefunden und zwar in Form eines kleinen Rudiments, das als kleine ellipsoidale oder halbmondförmige Vakuole am Hinterende erscheint. Bei *Op. ranarum* konnte er ein solches Organell nicht feststellen und er glaubt, daß infolge der blattähnlichen Körperform dieses Organell bei den flachen Opalinaarten viel weniger entwickelt sei, als bei den übrigen Arten.

Es gelang mir aber auch bei *Op. ranarum* ein stark entwickeltes Excretionsorganell festzustellen, das sogar stärker entwickelt war, als bei manchen cylindrischen Arten. Dieses Organell trifft hier in Form eines vielfach verzweigten Kanalnetzes in der hinteren Körperhälfte auf. Die Kanäle bestehen eigentlich aus zusammengeflossenen Vakuolen, welche man auch vereinzelt hier und da finden kann (Textfig. 4).



Textfig. 4. Excretionsorganell von *Op. ranarum*. LEITZ Obj. 3, Oc. 3.

An Schnitten sieht man, daß diese Kanäle sich nur im Entoplasma verbreiten (Taf. 12 Fig. 44). Die Kanäle und Vakuolen kommen direkt mit den Kernmembranen in Berührung. Keine Pulsation ist zu beobachten. Nach dem Hinterrande zu vereinigen sich die Kanäle nicht in einen gemeinsamen Kanal mit einer einzigen Öffnung, sondern sie sind im hintersten Teil sogar enger und mehr verzweigt als vorn. Die Excretionsöffnungen selbst waren nicht sichtbar; man kann sie aber bei der Ausscheidung der Körperchen leicht erkennen. Gewöhnlich beobachtete ich einen Streifen von solchen Körperchen, der genau von der mittleren Region des Hinterrandes ausging (Taf. 13 Fig. 4). Oft aber sind mehrere solcher Streifen zu sehen, von welchen die mittleren, etwas stärker als die übrigen sind, mit denen sie bis zu einem gewissen Grade verschmelzen. Ich hatte auch Fälle, wo von der ganzen hinteren Kante viele Schnüre ausgingen, die miteinander verklebt waren und eine Excretionsplatte bildeten (Taf. 13 Fig. 3). Das zeigt, daß bei *Op. ranarum* der Excretionsapparat mit mehreren Öffnungen an der Hinterkante nach außen mündet, von welchen die mittlere die größte und öfters in Gebrauch ist.

Die Funktion des Excretionsorganells bei *Op. ranarum* ist nicht immer zu beobachten. Die Excretionsstreifen und -platten sind oft in Kulturen zu sehen, die 1 oder 2 Tage gehungert haben, besonders in den im Spätherbst oder im Winter angesetzten.

Bei den Macrogametocyten und Macrogameten von *Op. ranarum* kommt das Excretionsorganell in Form einiger hintereinanderliegender Bläschen (Taf. 13 Fig. 16a, b, Taf. 12 Fig. 24) wie bei den cylindrischen Opalinen vor, da die Macrogametocyten und Macrogameten selbst bei *Op. ranarum* nicht flach, wie die erwachsenen, sondern spindelförmig sind. Bei den Gametocyten von *Op. ranarum* habe ich auch Excretionsstreifen beobachtet, die aus dem hintersten Punkt des Körpers genau so wie bei *Op. intestinalis* heraus gingen (Taf. 12 Fig. 16a, 18) (vgl. METCALF, Fig. 147, 248).

Reizbiologie.

Alle Autoren, die über Opalinen gearbeitet haben, bemerken, daß sich die Opalinen immer im Vorderende des Froschenddarmes befinden, wo sie sich in einem Haufen ansammeln. Die Ursache aber dieser Erscheinung blieb ungeklärt. In den Kulturen von Opalinen hatte ich zuerst Gelegenheit zu beobachten, wie sie beim Hineinsetzen in die Flüssigkeit nach dem Boden zu schwammen, was

mit einer Lupe leicht zu verfolgen war. Nach einigen Minuten sammelten sich die Opalinen gewöhnlich am Boden des Glases; das war eigentlich die Ursache, weshalb ich die Opalinen gewöhnlich in kleinen Zentrifugalgläschen zu züchten pflegte.

Um den Grad dieser positiven Geotaxis zu bestimmen, machte ich wiederholt den folgenden Versuch. Ich füllte ein ca. 3 mm breites und 25 cm langes Rohr mit ausgekochter PÜTTER'scher Flüssigkeit, stellte mit einer feinen Pipette *Op. ranarum* an einem Punkt hinein und ließ das Rohr horizontal liegen. Im Laufe 1 Stunde blieb die Hauptmasse der Opalinen ungefähr auf derselben Stelle liegen. Wenn ich ein solches Rohr (das an beiden Enden luftdicht zugestopft wurde) unter ca. 45° schräg stellte, sammelten sich die Opalinen binnen $\frac{1}{4}$ Stunde am unteren Ende. Wenn ich das Rohr nur ca. 20° schräg stellte, sammelten sie sich auch unten, aber es dauerte ein wenig länger, 30—40 Minuten. Mit der Lupe konnte ich die Bewegungen der Tiere beobachten, die herumschwammen und immer tiefer nach unten rückten.

Dieselben Versuche machte ich auch mit *Op. dimidiata* und bekam dieselben Resultate.

Der Mechanismus dieser Erscheinung scheint mir, wenigstens bei *Op. ranarum*, sehr einfach zu sein. Wenn man die Form dieser Opalinen untersucht, findet man, daß das Vorderende gewöhnlich spitz, das Hinterende bedeutend breiter und außerdem das Vorderende viel dicker als das hintere ist. Das Vorderende hat immer die Tendenz sich nach unten zu richten, nicht nur, weil es schwerer ist, sondern auch, weil das breitere Hinterende beim Sinken einen größeren Widerstand des Wassers zu überwinden hat. Der ganze Körper von *Op. ranarum* ist gleichmäßig mit Cilien bedeckt, die die Treibkraft erzeugen, ohne die ausschließliche Rolle bei der Bestimmung der Schwimmrichtung zu spielen. Die Bestrebung der Opalinen, sich immer nach unten zu richten, hat denselben Effekt, wie die Geotaxis anderer Infusorien, obwohl dort die Erscheinung gewöhnlich auf eine andere Weise erklärt wird. Der Einfachheit halber aber bezeichne ich sie auch bei Opalina als Geotaxis.

Wir haben schon gesehen, daß *Opalina ranarum* auch auf andere Weise zu schwimmen imstande ist, wobei sie ihre Steuervorrichtung benutzt, d. h. die Körperränder verschiedenartig umbiegt. Bei solch einem Schwimmen können sich die Opalinen in verschiedenen Richtungen bewegen, sogar auch aufwärts. Sie machen aber nicht immer von der Steuervorrichtung Gebrauch und infolgedessen haben sie gewöhnlich die Tendenz, sich stets nach unten zu richten.

Hat die positive Geotaxis irgendwelche biologische Bedeutung für die Tiere? Das wird leicht ersichtlich, wenn wir die Lage des Enddarms des Frosches in Betracht ziehen. Die Kloake liegt beim Frosch dorsal, das Ende des Dünndarms ventral und der Enddarm ist nach oben und etwas schräg nach hinten gerichtet. Wenn die Opalinen sich frei im Enddarm bewegen, haben sie immer die Tendenz, sich nach dem vorderen Ende des Enddarms, das tiefer liegt, zu richten und sich dort anzusammeln. Auf diese Weise werden die Opalinen mit der Kotmasse nicht ausgeworfen.

Spielt dabei nicht etwa die Bestrebung nach den aus dem Dünndarm kommenden Nahrungssäften eine gewisse Rolle? Zeigen die Opalinen nicht eine positive Rheotaxis? Ein ca. 8 mm breites und 30 cm langes Glasrohr wurde mit ausgekochter PÜTTER'scher Flüssigkeit gefüllt und mit einer Vorrichtung versehen, dank welcher die Flüssigkeit tropfenweise zu- und abfließen konnte. An eine Stelle im Glasrohr, das horizontal lag, setzte ich eine große Anzahl von *Op. ranarum*. Anfangs brachte ich die Flüssigkeit in außerordentlich schwache Bewegung, indem ich hin und wieder nur einen Tropfen ausfließen ließ. Die Opalinen zeigten keine Reaktion. Als die Strömung etwas stärker gemacht wurde, fingen die Opalinen an, sich in deren Richtung langsam zu bewegen. Während ich die Strömung ganz vorsichtig verstärkte, zeigten die Opalinen in keinem Momente irgendwelche Tendenz, stromaufwärts zu schwimmen. In der Zeit, wo die Opalinen bei sehr schwacher Strömung langsam in der Richtung schwammen, erhob ich das eine Ende des Rohres so, daß es nicht mehr horizontal, sondern unter einem Winkel von ca. 20° lag. Obwohl das Wasser im Rohr immer noch ganz langsam nach oben floß, fingen die Opalinen jetzt in entgegengesetzter Richtung zu schwimmen an und strebten nach dem unteren Ende des Rohres. Ein ca. 5 cm langer Ring aus schwarzem Papier, an dem sie vorbei mußten, übte keine Wirkung auf sie aus; das dunkle Feld wurde genau so passiert, wie das helle.

Die Opalinen zeigen also keine Rheo- oder Heliotaxis, sondern nur eine positive Geotaxis. Die Geotaxis ist aber so stark, daß sie den Opalinen ermöglicht, sich sogar gegen eine Strömung nach unten zu bewegen. Diese Fähigkeit hat auch biologische Bedeutung für diese Infusorien. Infolge der ständigen Zufuhr von Nahrungsresten aus dem Dünndarm, kommt es im breiten Enddarm des Frosches zu einer schwachen Bewegung, nach der Kloake zu. Die Opalinen aber überwinden diese Bewegung, wie bei meinem Versuch, und verlassen das Vorderende des Enddarms nicht. Nur die Stadien der

Opalinen, die die Bewegungsfähigkeit verloren haben, lassen sich von der Strömung mitschleppen und zusammen mit der Kotmasse hinauswerfen; das ist der Fall bei den Infektionscysten, die zu ihrer Entwicklung den Enddarm verlassen müssen. Andererseits können die Opalinen, die sich am Vorderende des Enddarms anhäufen, nicht weiter nach vorn schwimmen, weil im engen Dünndarm, dessen unterster Teil fast horizontal liegt, infolge der peristaltischen Bewegung ständig eine ziemlich starke Strömung nach dem Enddarm zu herrscht. Da dies die richtige Erklärung ist, zeigt uns das Verhalten der Opalinen im gestorbenen Frosch: dort verlassen die meisten Opalinen den Enddarm und dringen in den hintersten Teil des Dünndarmes ein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß dabei auch eine positive Chemotaxis in Wirkung tritt, weil der Dünndarm die Quelle der Nahrung für die Opalinen darstellt.

Um die biologische Bedeutung der positiven Geotaxis zu prüfen, habe ich eine Anzahl von lebenden Fröschen auf den Rücken gelegt, einige Stunden lang so liegen lassen und dann auf Opalinen untersucht. Einige der Frösche hatten den Enddarm mit sehr dickem Inhalt gefüllt, wodurch es den Opalinen unmöglich war, durchzudringen; in diesen Fröschen befanden sich die Opalinen noch am Vorderende des Enddarms. In den Fröschen aber, wo der Darminhalt etwas flüssiger war, konnten die Opalinen nach unten schwimmen und ich fand eine ganze Menge von *Op. ranarum* in der hinteren Hälfte des Enddarms.

Die biologische Bedeutung der Geotaxis läßt sich am besten bei den Stadien in den Kaulquappen sehen. Der Enddarm der Kaulquappen liegt nicht nach oben gerichtet, wie beim erwachsenen Frosch, sondern horizontal, im hintersten Abschnitt sogar etwas nach unten gerichtet. Bei dieser Stellung hätten die Opalinen mit ihrer positiven Geotaxis den Enddarm bald verlassen. Die Stadien von Opalinen, die sich in den Kaulquappen aus den Infektionscysten entwickeln, zeigen aber eine ganz andere Körperform und weisen keine positive Geotaxis auf. In einem schräg gestellten Rohr bleiben sie ungefähr dort, wohin man sie setzt. In den Kulturgläschen sammeln sie sich nicht am Boden wie die erwachsenen; das tun sie nur, wenn sie schon im Begriff sind, abzusterben.

Die Agamonten, die sich in den Kaulquappen entwickeln, weisen auch keine positive Geotaxis auf. Bemerkenswert ist, daß die Agamonten, wie wir später erörtern werden, nicht bis zur Größe der Froschopalinen heranwachsen, sondern sehr klein bleiben und sich bei dieser Größe zu teilen anfangen. Auf diese Weise vermeiden

sie das frühzeitige Erreichen des Zustandes der erwachsenen, der von der positiven Geotaxis begleitet ist, die jetzt einen Nachteil für die Tiere wäre. Die Umwandlung der Opalinen in solche mit positiver Geotaxis kann erst dann geschehen, wenn sich der Enddarm der Kaulquappen schon in den nach oben gerichteten Enddarm des jungen Frosches umgewandelt hat. Die Entwicklung der Parasiten in Beziehung auf ihre Geotaxis steht also mit der Entwicklung des Wirtes im Einklang.

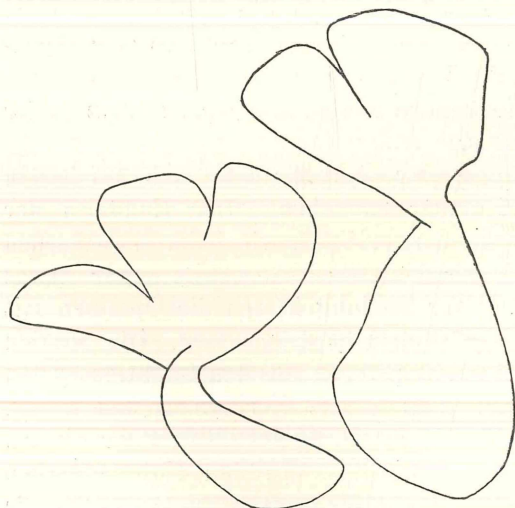
Vermehrung der Opalinen durch Teilung.

Die Teilung der vielkernigen Opalinen zeigt die Eigentümlichkeit, daß sie mit der Kernteilung nicht streng parallel vor sich geht. Infolgedessen können Individuen entstehen, die nach ihren Dimensionen, wie auch nach der Zahl der Kerne, sehr verschieden sind.

Die Teilung der Micro-, wie auch die der Macronuclei vollzieht sich während des ganzen Jahres, aber man findet zu jeder Zeit Individuen, in denen eine ungewöhnlich große Zahl von Macro- oder Micronuclei in Teilung geraten sind. Die Individuen von *Op. ranarum*

und *Op. dimitiata*, die ich in solchem Zustande beobachtet habe, waren nicht im Momente der Zellteilung. Die stärkste Kernteilung also ist auch nicht immer mit der Zellteilung verbunden.

In den Kulturen habe ich Fälle beobachtet, wo die Tochterindividuen in einer neuen Teilung begriffen waren, bevor sie sich voneinander getrennt hatten. Auf diese Weise bekommen wir, wenn nur eines von beiden Individuen in zweite Teilung geriet, eine Art vor-



Textfig. 5. *Op. ranarum*.

In Teilung begriffene Individuen, die sich nicht voneinander trennen. LETZ Obj. 3, Oc. 3.

übergehende „Kolonie“ von drei Individuen; wenn aber beide Individuen der ersten Teilung sich vor der Trennung wieder teilen, bekommen wir eine solche „Kolonie“ von vier Individuen (Textfig. 5).

In der Periode der Cystenbildung geht die Zellteilung in einem viel schnelleren Tempo vor sich und führt endlich zur Bildung von winzigen Individuen, die sich später encystieren. Die Längsteilung, die sonst den fast ausschließlichen Teilungstypus darstellt, wird jetzt auch von Teilung in verschiedener Richtung begleitet. Es kommen sogar Fälle vor, wo die Teilung in der Mitte von *Op. ranarum* anfängt. Es ist interessant zu bemerken, daß es eine Ähnlichkeit zwischen den Frühlingsteilungen, die der Geschlechtsvermehrung vorangeht, und der Vermehrung in den Kulturen besteht, die nicht gut gedeihen. Auch dort findet man Teilungen in verschiedenen Richtungen, wie auch Löcher in der Mitte des Körpers als Anfang einer Teilung.

Die Eigentümlichkeit der Teilung der vielkernigen Opalinen unterstützt die Auffassung, daß diese Infusorien von Formen mit einem Micronucleus abstammen: die Zellteilung ist bei den verschiedenen Arten im Vergleich mit der Kernteilung in verschiedenem Grade zurückgeblieben. Bei ein und derselben Art bleibt die Zellteilung zu verschiedenen Jahreszeiten nicht im gleichen Grade zurück.

Cystenbildung.

A. Dauercysten von Opalinen.

In einer Kultur von *Op. dimidiata*, der ich einige Tropfen sehr verdünnte Lösung von Traubenzucker (1:400) zugesetzt hatte, fand ich im Dezember encystierte erwachsene Tiere (Taf. 13 Fig. 5). Der Körper war etwas zusammengezogen, mit einer dicken Hülle versehen, die noch keine besondere Struktur besaß. Die Cilien, wie auch die Kerne waren nicht sichtbar. Der Inhalt sah ziemlich dunkel aus und gegen die Mitte zu befand sich ein Haufen von stark lichtbrechenden Tröpfchen und Kristalle von verschiedener Größe. Diese Dauercyste beobachtete ich noch einige Tage lang. Am nächsten Tag zeigte sich schon eine doppelte Hülle: Die äußere ganz hell und nicht gleichmäßig dünn, die innere fester. In der Mitte befanden sich schon viel mehr Tröpfchen, die kleiner waren, aber einen größeren Teil des Zellkörpers besetzten (Taf. 13 Fig. 6). In einem späteren Stadium hatte sich die innere Hülle verdoppelt und wies eine charakteristische Struktur auf (Taf. 13 Fig. 7, 8). Bei stärkerer Vergrößerung (Taf. 13 Fig. 7b) sah die innere Hüllenschicht wie aus radiär gestellten Säulen zusammengesetzt aus, die in ihrer Mitte einen Querstreifen hatten. Auf dieser Säulenschicht lag eine ganz dünne, helle, strukturlose Hülle; nach innen grenzte dieselbe Säulen-

schicht an den Zellinhalt. Dieser ganze Inhalt war mit Tropfen angefüllt und sehr dunkel. Gewöhnlich waren einige encystierte Tiere an einem Ende miteinander zusammengeklebt.

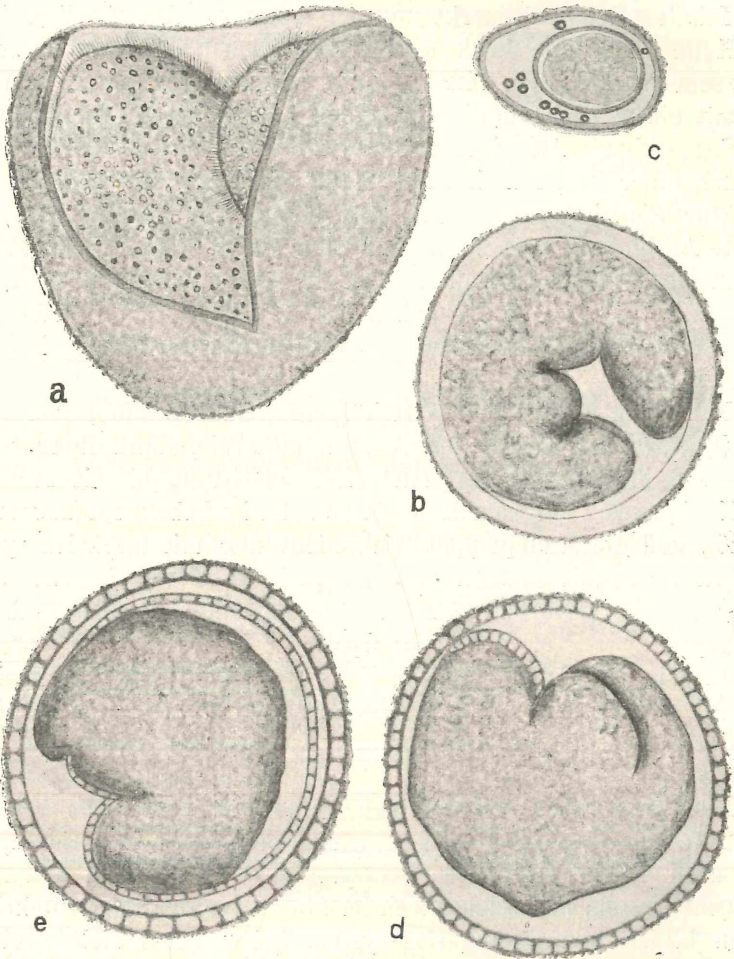
Die Schnitte von solchen Cysten, die mit Sublimatessig fixiert und mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gefärbt waren, zeigten genau die Struktur der gewöhnlichen nichtencystierten *Op. dimidiata*. Die Macro- und Micronuclei hatten das gewöhnliche Aussehen, einige Micronuclei waren im Prozeß der Teilung begriffen. Das Zellgerüst fehlte auch nicht und war im Ruhezustand (Taf. 12 Fig. 10).

Es ist klar, daß diese Dauercysten mit der Vermehrung nichts zu tun haben, sondern ein Mittel zur Lebenserhaltung der Tiere bei ungünstigen Umständen darstellen. Sie entsprechen also den Dauercysten, die auch bei anderen Infusorien bekannt sind. Sie müßten aber auch in der Natur vorkommen. Und in der Tat fand ich sie im Darm gestorbener Frösche. Darauf machte ich folgenden Versuch. Ich spritzte (im Januar) *Op. dimidiata* in den Dünndarm getöteter Frösche hinein, konnte auf diese Weise Schritt für Schritt den ganzen Prozeß der Encystierung verfolgen. 3—4 Tage leben die meisten Tiere in der Leiche frei; sie wurden nur dunkler, infolge der vielen angehäuften Excretionsteilchen. Später aber suchten alle Tiere in den Schleim des Darmes hineinzudringen, wobei sie diese Masse mit dem Vorderende durchbohrten. Sie machten sich im Schleim eine Art von Nestern, drehten sich lange Zeit darin herum und sonderten eine Gallertmasse aus, die eine Hülle um sie bildete (Taf. 13 Fig. 8). Diese Hülle wurde immer dicker und fester und bekam nach und nach die oben beschriebene Struktur; die Cilien wurden dabei unsichtbar und der Inhalt sehr dunkel.

Denselben Versuch machte ich auch mit einer flachen Art, nämlich mit *Op. ranarum* und bekam ähnliche Cysten. Es encystierten sich die großen, wie auch die kleinsten vorhandenen Individuen. Über dem Tiere bildete sich eine ziemlich dicke Hülle, die klebrig und infolgedessen immer mit Schmutzpartikelchen dick bedeckt war (Textfig. 6). Diese Tiere bogen sich verschiedenartig und besaßen noch bewegliche Cilien (a). In manchen Cysten war das Tier so gebogen, daß man den Eindruck bekam, als ob darin zwei Individuen nebeneinanderlagen. Eine nähere Untersuchung aber ergab, daß immer nur eine Opaline in den Cysten vorhanden war. Der Inhalt der Zellkörper sah auch bei diesen Cysten sehr dunkel aus, die Macro- und Micronuclei konnten in vivo nicht gefunden werden. Die Cysten waren grün. Diese Farbe aber hatten

die noch nicht encystierten Opalinen, was sehr oft zu beobachten ist, wenn der Inhalt des Froschdarms grün gefärbt ist.

So sahen die Cysten am dritten Tage nach der Encystierung im Darm des getöteten Frosches aus, wo einzelne Individuen noch



Textfig. 6. Dauercysten von *Op. ranarum*. a durch Druck geplatzte, b ganze Cyste; c kleine Cyste mit Doppelhülle; d Cyste mit äußerer Hülle und charakteristischer Struktur; e beide Hüllen der Cyste mit solcher Struktur.

frei herumschwammen. Am 4. Tage waren bei den meisten Tieren die Cilien nicht mehr sichtbar. Am 5. Tage fand ich schon zwei voneinander getrennte Hüllen. Die äußere war sehr hell und deut-

lich, die innere etwas dünner, aber fester. Sie besaßen keine besondere Struktur (Textfig. 6 c). Im Zwischenraum zwischen beiden Hüllen lagen immer einige helle Tropfen verschiedener Größe. Der Inhalt des Körpers war noch dunkler. Obwohl ich keine Cilien sah, wies das Tier schwache Bewegungen auf, die an einem „Fließen“ des Inhaltes leicht bemerkt werden konnten. Am 7. Tage hatte die Hülle schon eine Struktur, die der Hüllenstruktur von *Op. dimidiata* sehr ähnelte. Das Tier lag darin zusammengezogen, bewegungslos, mit einem noch dunklen, körnigen Inhalt; keine Cilien machten sich bemerkbar. An einer Stelle dicht über dem Körper war der Anfang einer anderen inneren Hülle sichtbar, die fast dieselbe Struktur wie die äußere besaß, aber dünner war (Textfig. 6 d). Die vollste Ausbildung erreichten die Cysten am 10. Tage. Beide Hüllen hatten eine deutliche Struktur und die innere erstreckte sich über den ganzen Körper. An manchen Stellen lag sie dicht darüber, an anderen bildete sich zwischen dem Körper und der Hülle ein Raum (Textfig. 6 e).

Nach dem Zerfall des Wirtskörpers gelangen die Dauercysten von Opalinen ins Wasser und dort können sie, dank ihrer festen Hüllen, wahrscheinlich sehr lange Zeit aushalten, bis sie eventuell von Kaulquappen aufgenommen werden. Es ist bekannt (METCALF 35, p. 315), daß die Kaulquappen sich nicht nur mit Infektionscysten, sondern auch mit erwachsenen Opalinen infizieren lassen, wenn solche an sie verfüttert werden. Sie können sich also auch mit Dauercysten von erwachsenen Opalinen infizieren. Andererseits müssen wir erwähnen, daß die Zeit, wo die Frösche am meisten sterben, und zwar der Winter, das Frühjahr und die Laichperiode, von der Saison der Entwicklung der Kaulquappen nicht sehr entfernt ist.

Die Dauercysten von Opalinen waren bis jetzt nicht bekannt. LÉGER u. DUBOSCQ haben außer den gewöhnlichen Infektionscysten noch zwei Sorten von Cysten bei *Op. ranarum* beobachtet und zwar: endogene Cysten, bei welchen sich im Innern der Opalinen Infektionscysten bilden und Conjugationcysten, bei welchen sich zwei Individuen in einer Infektionscyste zusammen encystieren. Die von mir beobachteten Dauercysten von erwachsenen Opalinen können nicht die von LÉGER u. DUBOSCQ sein. Die Dauercysten von Opalinen sind um so interessanter, als sie die Tiere nicht gegen Austrocknung schützen, wie es bei den Infusorien gewöhnlich der Fall ist, sondern in Zusammenhang mit der Änderung der Lebensbedingungen im Wirtstier selbst stehen.

B. Bildung von Infektionscysten.

Wie schon seit ZELLER bekannt ist, geraten die Opalinen in bestimmten Zeiten im Frühling, je nach der Art, in einen Zustand sehr schneller Teilung, die endlich zur Bildung der Infektionscysten führt. In dieser Beziehung kann ich nur die von ZELLER, NERESHEIMER n. a. gemachten Beobachtungen bestätigen. Bei *Op. ranarum* hören die kleinen Individuen vor der Cystenbildung auf, sich zu bewegen, drehen sich sehr schnell um sich selbst herum, wobei sie eine Gallertmasse ausscheiden. Es kommt ein Moment, wo das Tier ganz in dieser Masse liegt und sich nicht mehr bewegt, da seine Cilien in dem Schleim festkleben (Taf. 13 Fig. 9a). Dann aber zieht sich die Gallerthülle etwas zusammen, wird dünner, aber fester, und die Cilien werden wieder frei und machen sich durch ihre Bewegungen bemerkbar (Taf. 13 Fig. 9b). Die Größe dieser Cysten wie auch die Zahl ihrer Micronuclei ist ziemlich verschieden (von 30—70 μ).

Das ist die gewöhnliche Art der Cystenbildung, die sämtliche Autoren seit ZELLER beobachtet haben. Ich fand aber auch eine zweite Art der Cystenbildung bei *Op. ranarum*, die bis jetzt nicht beobachtet worden ist. Das ist die Bildung der Infektionscysten im Innern der encystierten erwachsenen Opalinen.

Diese Cysten (Taf. 13 Fig. 13) sind aus zwei Hälften zusammengesetzt, die eine konische Form haben und durch eine sehr lockere Masse untereinander verbunden sind. Die beiden Hälften sind aus einer hornartigen, braunschwarzen, sehr harten Substanz gebaut und bestehen aus zwei ineinandergelegten Schälchen; manchmal sind es auch mehr als zwei (Taf. 12 Fig. 25). In dem Inneren befinden sich die Infektionscysten selbst (Taf. 13 Fig. 10), die in einer Masse liegen, die eine Art Restkörper darstellt. Die beiden Hälften der Cyste sind meistens, infolge der sehr lockeren Verbindung, schon voneinander getrennt (Taf. 13 Fig. 12), so daß ich unter den vielen Hunderten von Cystenhälften nur hier und da eine ganze Cyste finden konnte.

Die Infektionscysten, die in diesen Gebilden lagen, hatten das Aussehen der gewöhnlichen Infektionscysten. In manchen Fällen konnte ich solche Cysten beobachten, die nicht vollkommen gebildet waren (Taf. 13 Fig. 11). Sie stellten Stücke vom Opalinenkörper dar, die sich getrennt hatten und im Begriff waren, eine Hülle um sich herum auszuscheiden. Sie hatten sich noch nicht abgerundet, die Cilien aber waren nicht mehr sichtbar.

In demselben Frosch, wo ich eine ganze Masse von Infektionscysten enthaltenden Cysten fand, waren auch viele kleine Opalinen vorhanden, die gewöhnliche Infektionscysten bildeten. Auf fixierten und gefärbten Präparaten (Taf. 12 Fig. 25), wo die großen Cysten schon durchsichtig sind, kann man auch die Anordnung der Infektionscysten in deren Inneren beobachten. Die letzten waren meistens gegen die Spitzen der großen Cysten gruppiert, wobei jede Infektionscyste in einer kleinen Vertiefung lag.

Alle Infektionscysten, von kleinen Opalinen oder in encystierten erwachsenen Tieren gebildet, haben sehr starke Hüllen, die ihre Lebensfähigkeit sichern, wenn sie auch einige Wochen im Wasser gelegen haben. Wegen dieser starken Hüllen lassen sich die Cysten gewöhnlich sehr schwer fixieren und färben; verhältnismäßig am leichtesten gelingt die Fixierung mit Pikrinessigsäure und die Färbung mit Hämatoxylin nach DELAFIELD. An solchen Präparaten kann man deutlich neben einigen Micronuclei auch eine ganze Menge Macronuclei sehen (Taf. 12, Fig. 26, 30 f.). Weder bei den Micronuclei, noch bei den Macronuclei der Infektionscysten habe ich Teilungsmomente festgestellt.

LÉGER u. DUBOSCQ haben bei *Op. ranarum* endogene Cysten beschrieben, die sich im Körper dieser Infusorien bilden und ihn später verlassen. Obwohl eine gewisse Ähnlichkeit zwischen diesen Cysten und den von mir beschriebenen besteht, halte ich sie für verschieden, weil meine Cysten im Innern eines encystierten Tieres entstehen und erst nach dem Platzen dieser Cyste frei werden.

Ich hatte eine ganze Menge von fertig gebildeten Cysten von *Op. ranarum*, die endogene Infektionscysten enthielten. Mir fehlten aber die früheren Stadien dieser Gebilde. Deshalb sollen künftige Untersuchungen ihre Bildung wie auch ihre biologische Bedeutung klar machen.

C. Anlaß zur Bildung der Infektionscysten.

Die Bildung der Infektionscysten gerade in der Laichzeit der Frösche ist eine leichtbegreifliche biologische Anpassung der Opalinen. Wodurch aber wird das bewirkt? Steht die Bildung der Cysten in Zusammenhang mit dem physiologischen Zustande des Wirtes? Wird die Bildung der Cysten etwa von den Hormonen des Wirtes auf irgendwelche Weise hervorgerufen oder ist sie umgekehrt von Faktoren abhängig, die im Parasit selbst zu suchen sind?

Im Januar hielt ich einige *Rana temporaria* in einem Raum bei 16—18° C Temperatur; nach 2 Wochen fand ich im Enddarm Cysten,

aber nur sehr wenige. Alle übrigen Tiere waren nicht in die charakteristische Teilung geraten, die zur Bildung von Infektionscysten führt. Solche Cysten im Winter hat auch ZELLER (54, p. 356) erzielt. Die Frösche selbst wurden nicht brünstig, was uns zeigt, daß die Bildung der Cysten nicht von einer Änderung des physiologischen Zustandes des Wirtes verursacht wird. In der Laichzeit habe ich junge *R. temporaria* untersucht und wie LÖWENTHAL Infektionscysten massenhaft gefunden; dasselbe Resultat erhielt ich auch mit jungen *R. esculenta*. Das ist ein weiterer wichtiger Beweis, daß zur Bildung dieser Cysten ein Brunstzustand des Wirtes nicht erforderlich ist.

Die Nahrung des Wirtes kommt hier auch nicht in Betracht. Die Frösche, die den ganzen Winter über gehungert hatten, enthielten im April Massen von Infektionscysten, obwohl sie immer noch keine Nahrung bekamen.

Die Temperatur allein kann uns die Erscheinung auch nicht erklären. Im Januar brachte sie zur Teilung und Cystenbildung nur einzelne Individuen, die Mehrzahl aber blieb unbeeinflusst. Andererseits scheint die Temperatur bei verschiedenen Arten nicht dieselbe Bedeutung zu haben. *R. temporaria* enthielt kurz nach den Frösten, einige Tage nachdem sie vom Winterschlaf erwacht, Massen von Cysten, weil die Laichzeit bei dieser Art sehr früh beginnt. *Bombinator* wieder habe ich mit *Op. intestinalis* und *Op. caudata* noch am 12. April ohne Cysten gefunden; diese enthielt auch noch am 15. Mai keine Cysten; ein ganzer Monat Wärmezeit war für sie nicht genügend, die Bildung der Infektionscysten herbeizuführen. Biologisch ist das leicht erklärlich, weil diese Art erst zu Anfang Juni laicht. Andererseits kommt es im Sommer, wenn die Temperatur am höchsten ist, nur ausnahmsweise zur Bildung von Infektionscysten. Die Temperatur allein kann uns also keine entscheidenden Aufschlüsse zur Klärung der Frage geben.

Wir sind gezwungen, anzunehmen, daß die Hauptfaktoren im Parasiten selbst liegen. In den Opalinen müssen sich manche Prozesse abspielen, die die Teilung zur Cystenbildung vorbereiten. Einer von diesen Prozessen scheint auch die Anhäufung von Reservestoffen im Endoplasma zu sein, die die Produktion ungeheurer Mengen von Cysten nach schneller Teilung in kurzer Zeit ermöglicht. Die Reservestoffe werden nicht in Form von festen Körperchen aufgespeichert, weil keine neuen derartigen Körperchen in der Periode vor der Cystenbildung im Endoplasma auftreten; sie kommen wahrscheinlich in Form von gelösten Substanzen ins Ento-

plasma. Infolgedessen macht sich ein Unterschied in der Färbung der Opalinen im Herbst und Frühling auffallend bemerkbar. Das Entoplasma bei *Op. ranarum* färbt sich im Herbst sehr schwach und läßt sich leicht differenzieren, im Frühling färbt es sich umgekehrt sehr stark und gute Differenzierung ist manchmal fast unmöglich. Deshalb eignen sich die Opalinen zu cytologischen Untersuchungen am besten im Spätherbst oder im Winter.

Die Anwesenheit reichlicher Reservestoffe in den Opalinen in der Laichzeit läßt sich auch experimentell nachweisen. Am 6. März setzte ich folgende Kulturen von *Op. ranarum* an. I. Gruppe, 4 Kulturen: Tägliche Fütterung 2½ Stunden mit sterilem, pulverisiertem und abgekochtem Eiweiß, dann mehrmalige Durchspülung mit reiner PÜTTER'scher Flüssigkeit. II. Gruppe, 4 Kulturen: behandelt wie Gruppe I, die Nahrung aber nach nur 5 Minuten entfernt. III. Gruppe, 4 Kulturen: keine Nahrung, bekamen aber das Wasser von der letzten Durchspülung der Kulturen von der Gruppe I. IV. Gruppe, 4 Kulturen: keine Nahrung, Wechseln der Flüssigkeit wie bei den übrigen Gruppen.

Jeden Tag wurden alle Kulturen in neue Gläschen gebracht. Bis zum 16. März lebten alle Kulturen gut. Am 18. März waren schon viele Individuen von den Kulturen der Gruppen II, III und IV gestorben, die Kulturen der Gruppe I waren normal. Am 20. März waren nur noch einzelne Individuen in den Gruppen II, III und IV lebendig, am 23. März waren alle Kulturen dieser Gruppen abgestorben. Die Kulturen der Gruppe I lebten immer noch, wurden bis zum 1. April geführt und dann vernichtet.

Wie wir schon gesehen haben, können die *Op. ranarum* im Herbst und Winter einen Hunger von 4—6 Tagen aushalten; hier hielten 12—17 Tage aus. Diese Untersuchungen unterstützen andererseits nochmals die Behauptung, daß die Opalinen auch feste Partikelchen ausnutzen können. Die Kontrollkulturen der Gruppen II und III zeigen uns einerseits, daß eine ganz kurze Zeit von 5 Minuten den Opalinen nicht genügt, die Eiweißpartikelchen auszunutzen, andererseits tritt zutage, daß die Opalinen der Gruppe I nicht etwa von den Resten der Nahrung lebten, die in den Gläschen blieben und später von den Bakterien zersetzt wurden. Denn mit der Flüssigkeit, die die letzte Durchspülung der Gruppe I ergab, konnten die Opalinen der Gruppe III, denen sie zugegeben wurde, nicht leben: sie enthielt also keine Nahrungspartikelchen mehr.

D. Direkte Umwandlung von Infektionscysten in Agamonten.

Bei den Infektionsversuchen mit Kaulquappen habe ich bemerkt, daß neben den verschiedenen Stadien der Gametenbildung, wo die Macronuclei im Prozeß des Zerfallens begriffen waren, sich auch viele kleine Opalinen befanden, wo dieser Prozeß nicht eingetreten war, die also keine Stadien der Gametenbildung darstellen konnten. Ich stellte neue Infektionsversuche an und beobachtete die Entwicklung der jungen Tiere vom Ausschlüpfen bis zur Zeit der Copulation, die erst vom 3. Tage an stattfand. In der Tat fand ich schon am 2. Tag junge Opalinen, die die charakteristische Form der Agamonten besaßen und die Macronuclei enthielten, die gar nicht verändert waren und das Aussehen der Macronuclei der Infektionscysten hatten (Taf. 13 Fig. 27 a, b). Als die in Gametenbildung begriffenen Tiere sich teilten, immer kleiner wurden und am 3. und 4. Tag die kleinsten Dimensionen erreichten, wuchsen die oben genannten Opalinen immer weiter heran und schon am 4. Tag erreichten sie die Größe von $85\ \mu$, die Maximalgröße, die ich überhaupt bei den Opalinen der jungen Kaulquappen gemessen habe (Taf. 13 Fig. 28 a, b). Die Zahl der Micronuclei hatte zugenommen, die zahlreichen Macronuclei zeigten das gewöhnliche Aussehen und bei Färbung ließen sich noch deutlicher erkennen; im Entoplasma waren auch kleine Excretionskörperchen vorhanden. Die Cilien bedeckten den ganzen Körper, das Hinterende nicht ausgenommen.

Welches die Bedingungen sind, von denen abhängt, ob eine Infektionscyste sich zu Gameten oder direkt zu Agamonten entwickelt, das konnte ich nicht ermitteln.

Geschlechtliche Vorgänge.

A. Gametenbildung.

Zum ersten Male wurde Gametenbildung und Copulation bei Opalinen von NERESHEIMER beschrieben; später bestätigte sie METCALF. Einzelne Momente der Gametenbildung sind auch früher von verschiedenen Autoren (ENGELMANN, ZELLER, LÉGER und DUBOSCQ) beobachtet und abgebildet worden, aber niemand hat ihnen die richtige Bedeutung zugeschrieben.

Lebendige Gameten sah NERESHEIMER nur bei *Op. dimidiata*; einige solche Stadien von *Op. ranarum* sind ihm von gefärbten

Präparaten bekannt. Den Copulationsvorgang hat er auch nur bei *Op. dimidiata* verfolgt und zwar in einem einzigen Fall. Die Größendifferenzen der Gameten sind nach NERESHEIMER nicht sehr bedeutend und er bezeichnet die Gameten als Isogameten. Nach der Copulation nimmt die Zygote eine Birnenform an, später wird sie ganz kugelförmig, bekommt eine Hülle und tritt so in das Stadium der Cystozygote. Diese letzte verhält sich nach NERESHEIMER ganz wie die Infektionscysten: das Tier zeigt anfangs keine Cilien und füllt seine Hülle vollständig aus, später ist der Cilienbesatz wieder deutlich zu erkennen und das Tier rollt sich im Innern der Cyste wieder in Windungen auf. Das Ausschlüpfen der jungen Agamonten aus der Cystozygote hat NERESHEIMER auch nicht verfolgt. Er beschreibt aber junge Agamonten, in denen „die Kügelchen, resp. die scheibenförmigen Körperchen wieder reichlich auftreten“. Mit dem Heranwachsen der Agamonten „ist auch die normale Menge der Kügelchen und scheibenförmigen Körperchen schon wieder erreicht“ (38, p. 30).

METCALF, der die Gametenbildung und Copulation, besonders die Kernerscheinungen, die sich dabei abspielen, eingehend verfolgt hat, ist in zwei wesentlichen Punkten mit NERESHEIMER nicht einverstanden. Er hat seine Untersuchungen über *Op. intestinalis*, *Op. caudata* und *Op. dimidiata* gemacht und überall eine ausgesprochene Anisogamie festgestellt. Die von NERESHEIMER bei *Op. dimidiata* beobachtete Copulation hält METCALF für keine echte Copulation, sondern für eine anormale Annäherung von zwei Macrogametocyten. Die Gametenbildung und Copulation bei *Op. ranarum* ist auch METCALF nicht bekannt.

Die Encystierung der Zygoten, die NERESHEIMER bei *Op. dimidiata* beobachtet und abgebildet hat, hält METCALF für anormal. „There seems no doubt that these instances of encystment and all others observed were abnormal and pathologic. I have never found encysted zygotes in material from old infections and I believe encystment after copulation does not normally occur“ (35, p. 296).

Lange Zeit aber vor NERESHEIMER hatten ENGELMANN und ZELLER dieselben Cystozygoten bei *Op. ranarum* sicher gesehen und beschrieben, ohne zu vermuten, daß sie das Endresultat eines Geschlechtsprozesses darstellen. Diese Beobachtungen machten auch METCALF in seiner Ablehnung der Cystozygoten unsicher. „On other hand, schreibt er, the description by ENGELMANN and by ZELLER for multinucleated *Opalinae*, of uninucleated cysts with large nuclei, in the

recta of the tadpoles, seems to indicate the presence of a second type of cysts, which might well be copulation cysts“ (p. 297).

Und zum Schlusse sagt er: „Encystment after copulation seems to be doubtful. The matter needs further study“ (p. 297).

Ich habe versucht, diese beiden Fragen, nämlich die Frage nach der Iso- oder Anisogamie und nach den Cystozygoten und deren biologischen Bedeutung bei *Op. ranarum* zu erforschen, wo eben die Gametenbildung und Copulation bis jetzt nicht bekannt waren.

Enddarminhalt von *R. temporaria*, der reichlich Infektionscysten von *Op. ranarum* enthielt, ließ ich 2—7 Tage in Wasser liegen, damit alle nichtencystierten Opalinen getötet würden. Mit solchen Cysten wurden mehrmal Kaulquappen infiziert, die aus Laich gezüchtet, mit abgekochter Nahrung gefüttert und infolgedessen nicht infiziert waren.

Zwei Stunden nach der Infektion findet man schon ausgeschlüpfte junge Tiere, die den Enddarm der Kaulquappen erreicht haben, wie auch noch ganze Cysten, die überall im Darmkanal verstreut sind und sich in Vorbereitung zum Ausschlüpfen befinden. Beim Ausschlüpfen durchbohrt das Tier mit dem Vorderende die schon sehr dünn und zart gewordene Cystenhülle, läßt sein Vorderende durch das Loch hinausragen und dreht sich herum, wobei das Loch immer größer wird (Taf. 13 Fig. 9c). Nach einiger Zeit zieht das Tier sein Vorderende zurück, dreht sich rasch im Innern der Cyste, schiebt dann sein Vorderende wieder in das Loch hinein. Nach einigen solchen Versuchen gelingt es ihm, sich von der Hülle loszumachen und es fängt frei zu schwimmen an. In manchen Fällen trägt das Tier an seinem Hinterende den Rest der Hülle eine Zeitlang (Taf. 13 Fig. 14). Gewöhnlich aber schiebt es sich in die Schmutzmasse hinein, wobei die Cystenhülle stecken bleibt und das Tier vollkommen frei wird.

Das junge Tier hat eine ganz dünne und biegsame Pellicula, infolgedessen kann sein Körper sehr leicht die Form ändern und wieder die gewöhnliche Gestalt annehmen, die sehr verschieden von der der erwachsenen Opalinen ist. Diese Stadien haben einen fast walzenförmigen nach vorn stumpf, nach hinten spitzig endigenden Körper, der nicht ganz gleichmäßig mit Cilien besetzt ist. Die Cilien sind am beweglichsten in der vorderen Hälfte, nach dem Hinterende zu werden sie kürzer und nicht so wirksam. Das Hinterende selbst scheint mit Cilien nicht versehen zu sein. Beim Schwimmen dreht sich das Tier eine Zeitlang nach links, dann nach rechts herum. Keine Steuervorrichtungen, wie bei den Erwachsenen

kommen hier in Wirkung, alle Bewegungen werden also ausschließlich von den Cilien bedingt. Nur selten sieht man schwache Längsfurchen sich bilden, die auch vielleicht als Steuervorrichtung dienen können (Taf. 13 Fig. 15 e). Der Inhalt ist ganz hell. Neben den Excretionskörperchen, die sich manchmal in beträchtlichen Mengen in der Hinterhälfte anhäufen (Taf. 13 Fig. 15 d), sieht man die Micronuclei, die nicht mehr die gewöhnliche, durch eine feste Membran streng bestimmte Form haben, sondern als Klümpchen lichtbrechender Substanz von verschiedener Größe und Form den ganzen Inhalt ausfüllen oder nur gegen die Peripherie gedrängt sind.

Nach der mehrmaligen Teilung, deren Zahl ich nicht genau feststellen konnte, bemerkt man, daß sich zwei Sorten von Gametocyten bilden. Die einen (Taf. 13 Fig. 16—18) haben einen fast runden Querschnitt und ihre Membran scheint ziemlich fest zu sein, weil ihre Form sehr konstant ist. Die Verteilung der Cilien ist wie bei den Tieren, aus denen sie durch Teilung hervorgingen. Excretionskörperchen im ganzen Körper, wie auch am Hinterende Excretionsstreifen, sind oft zu sehen. Diese Gametocyten führen zur Bildung der Macrogameten, die ungefähr $30\ \mu$ lang und ca. $8\ \mu$ breit und etwas gekrümmt sind, mit stumpfem Vorder- und zugespitzten Hinterende, das, wie bei den Macrogametocyten, keine Cilien zu besitzen scheint (Taf. 13 Fig. 19). Der Inhalt ist hell, von der Macronuclei-substanz sieht man nur winzige Klümpchen oder kleine Stäbchen von verschiedener Länge, neben denen auch andere Körperchen von stark lichtbrechender Substanz sichtbar sind. Wenn man diese Stäbchen von zerfallenen Macronuclei mit GENTIAN-Violett in vivo zu färben versucht, zerfallen sie infolge der vollen Abwesenheit der Kernmembran in einigen Sekunden in kleine Tröpfchen, obwohl das Tier noch ganz lebendig ist (Taf. 12 Fig. 30 d, e). (Wenn man die Macronuclei der erwachsenen Opalinen mit GENTIAN-Violett färbt, lassen sie sich anfangs nicht färben, nach kurzem aber werden sie schon gefärbt, wobei sie ihre Form vollkommen behalten und ihre Membran noch deutlicher wird.) Der Micronucleus der Macrogameten ist länglich und ungefähr in der Mitte gelegen (Taf. 12 Fig. 27).

Die zweite Sorte von Gametocyten sind flach, etwas gebogen, das Hinterende wieder ohne Cilien (Taf. 13 Fig. 20, 21). Im Innern derselben sieht man, wie bei den Macrogameten, die Reste der Macronuclei. Die Microgametocyten teilen sich mehrmals — die Zahl der Teilungen konnte ich nicht feststellen — und bringen die Microgameten hervor. Man findet zuerst Stadien (Taf. 13 Fig. 22) mit

einer dickeren vorderen und dünneren hinteren Hälfte, die von den bisherigen flachen Formen ziemlich abweichen. Durch die Endteilung (Taf. 13 Fig. 23 a) werden die Microgameten selbst gebildet, die einen ziemlich langen Schwanz besitzen, der, wenigstens gegen die Spitze, keine Cilien zu besitzen scheint (Taf. 13 Fig. 23 b). Gewöhnlich messen die Microgameten ca. $28\ \mu$, es kommen aber auch Individuen mit länger ausgezogenem Schwanz vor, die bis $35\ \mu$ lang sind. Der einzige Micronucleus, der auch länglich ist, liegt in der vorderen, dickeren Hälfte. Das Schwanzende scheint manchmal etwas verdickt. Excretionsvakuolen sind manchmal in den Microgameten auch zu finden, ich habe sogar solche bei Individuen in Copulation gesehen. Die Microgameten bewegen sich lebhaft und schwimmen sehr oft mit dem Schwanzende nach vorn. Wie die Macrogameten weisen sie auch keine Steuervorrichtungen auf.

B. Copulation.

Die Gameten, die ich gewöhnlich in ausgekochter PÜTTER'scher Flüssigkeit beobachtet habe, pflegen sich an einigen Punkten unter dem Deckglas zu sammeln, wo auch viele Copulationsmomente zu beobachten sind. Ich habe eine ganze Menge von Copulationsstadien von *Op. ranarum* gesehen. Die Befestigung des Micro- an dem Macrogameten vollzieht sich auf ziemlich verschiedene Weise. Am häufigsten befestigt sich der Microgamet an dem Hinterende des Macrogameten und bald kleben sie an der ganzen Länge des Microgameten zusammen (Taf. 13 Fig. 24 a). Sehr oft findet man Copulationsstadien, wo der Microgamet mit dem Vorderende an der hinteren Hälfte des Macrogameten anliegt und der Schwanz eine Zeitlang frei nach hinten hängt. Der vordere Teil des Microgameten kann dabei ungefähr parallel der Längsachse des Macrogameten oder quer zu derselben liegen. Der Microgamet kann sich auch mit dem Hinterende an dem Macrogameten befestigen. Das geschieht in der Vorder- oder Hinterhälfte des Macrogameten, wobei das Vorderende des Microgameten nach vorn oder nach hinten gerichtet ist (Taf. 13 Fig. 25 a—g). Nach ungefähr 20—30 Minuten vom Anfang der Copulation gerechnet, verschwindet die Grenze zwischen beiden Individuen (Taf. 13 Fig. 24 b, c) und der Microgamet bleibt als ein Auswuchs an dem Macrogameten stehen. Binnen einer Stunde nach dem Anfang der Copulation ist gewöhnlich die Verschmelzung beider Individuen vollkommen.

Nach der Copulation zieht sich die Zygote, die immer noch sehr beweglich ist, etwas zusammen und nimmt eine Birnenform an

(Taf. 13 Fig. 26 a, b); jetzt werden die beiden Kerne sehr deutlich (Taf. 12 Fig. 28). Dann dreht sich das Tier sehr schnell herum, bleibt dann still liegen, kugelt sich ab und nach einigen Minuten sondert es eine Hülle von sich ab (Taf. 13 Fig. 26 c). Die Cilien verschwinden offenbar, werden wohl eingezogen, da sie nicht abfallen. Sehr oft schrumpft die Cystenhülle etwas zusammen (Taf. 13 Fig. 26 d).

Obwohl die Gametenbildung bei *Op. ranarum* bis jetzt nicht beschrieben wurde, haben manche Autoren einzelne Stadien derselben gesehen und abgebildet, ohne freilich zu vermuten, daß sie Gametenbildung vor sich gehabt haben. ENGELMANN (10, p. 575) gibt die Microgameten (seine Taf. XXI Fig. 3 und 4), die Macrogameten (ibidem Fig. 5 und 6) und die Cystocygoten (ibidem Fig. 2) ziemlich genau wieder; nur die Micronuclei sind von ihm anstatt oval rund dargestellt. ZELLER (p. 362) hat die Cystozygoten und die Microgameten gesehen; die letzteren hält er aber für Anomalien.

Die Encystierung der Zygoten bei *Op. ranarum* ist eine normale Erscheinung, die jeder Copulation folgt. In diesem Zustand findet auch die Bildung des Syncarions statt (Taf. 13 Fig. 26 e). In den Cystozygoten sieht man *in vivo* ganz deutlich die Micronuclei, aber keine Macronuclei. Noch deutlicher wird das, wenn man *in vivo* mit GENTIAN-Violett (Taf. 12 Fig. 30 g) oder fixierte Präparate färbt: keine Spur von Macronuclei ist mehr vorhanden (Taf. 12 Fig. 28, 29). Die Behauptung von NERESHEIMER, daß die Cystozygote ein normales Stadium vom Entwicklungskreis der Opalinen darstellt, ist wenigstens bei *Op. ranarum* ganz richtig; sie wird auch durch die Beobachtungen von ENGELMANN und ZELLER bestätigt. Die Isogamie aber, die NERESHEIMER nach einer einzigen Beobachtung *in vivo* den Opalinen zuschreibt, ist in Wahrheit bei diesen Infusorien keine normale Lebenserscheinung. METCALF hat für *Op. dimidiata*, *Op. intestinalis* und *Op. caudata* und ich für *Op. ranarum* festgestellt, daß überall eine ausgesprochene Anisogamie vorkommt.

Bei der Copulation fand METCALF Macrogameten mit zwei Kernen (d. h. Micronuclei) und beobachtete bei solchen Macrogameten sogar die Copulation. Zweikernige Macrogameten bei *Op. ranarum* habe ich nicht gesehen; alle Macro- und Microgameten besaßen nur einen Micronucleus und keine Macronuclei.

Die Conjugation der Gameten bei den Opalinen erinnert uns an die Conjugation der Vorticelliden, mit welchen sie auch METCALF vergleicht (35, p. 307).

C. Folgeerscheinungen der Copulation.

Die Cystozygoten, wie NERESHEIMER richtig bemerkt (p. 32), verhalten sich wie die Infektionscysten. Wie die letzteren zeigen sie nach einer Ruhepause ihre Cilien im Innern der Cyste wieder. Sie können aber nicht, wie es auch bei den Infektionscysten der Fall ist, ständig im Enddarm der Kaulquappe bleiben und werden mit dem Kot entleert. Um ihr weiteres Schicksal festzustellen, ließ ich den Darminhalt von infizierten Kaulquappen einmal 24, ein anderes Mal 48 Stunden im Wasser liegen, damit alle nichtencystierten Tiere getötet würden und verfütterte solche Cystozygoten an nichtinfizierte Kaulquappen. Ich bekam junge Opalinen, die Agamonten darstellten und von den Stadien der Gametenbildung ganz verschieden waren. Daß in der Natur die Cystozygoten auch im Darm der Kaulquappen, wo sie gebildet sind, ausschlüpfen können, halte ich für unwahrscheinlich, weil die Kaulquappen sehr oft Kot entleeren, wobei auch die Cystozygoten ins Wasser gelangen. Ich habe die Cystozygoten im Darminhalt der Kaulquappen, der mit PÜTTER'scher Flüssigkeit etwas verdünnt war, einen Tag gehalten, ohne Ausschlüpfen derselben zu bemerken. Dieser Zeitraum aber genügt vollkommen zur Entleerung des Darminhaltes der Quappen.

Das Verhalten der Cystozygote ähnelt dem entsprechenden Prozeß bei den Infektionscysten. Ich fand Tiere, die eine Zeitlang die Reste der Cyste an ihrem Hinterende trugen (Taf. 13 Fig. 29). Die Agamonten wachsen bald heran und die Micronuclei nehmen an Zahl zu. Ihre Form ist anfangs walzenförmig, der ganze Körper ist mit Cilien bedeckt (Taf. 13 Fig. 30 a, b). Später wird er aber etwas abgeplattet, mit einer charakteristischen Ecke an einer Seite vorn (Taf. 13 Fig. 31 a, b). In diesem Stadium sind die Macronuclei schon wieder da, sehr deutlich, mit guter Membran versehen und haben eine konstante Form, die beim Färben noch deutlicher zu sehen ist. Das Zerfallen der Macronuclei während der Gametenbildung und ihr Auftreten bei den jungen Agamonten hat schon NERESHEIMER beobachtet und beschrieben. Parallel mit dem Wachsen der Agamonten erscheinen von neuem auch die Macronuclei und nach diesem Autor ist bei Stadien mit vier Kernen (Micronuclei) „auch die normale Menge von Kügelchen und scheibenförmigen Körperchen schon wieder erreicht“ (p. 30).

Bemerkenswert ist, daß die Agamonten in den jungen Kaulquappen nicht bis zur Größe der erwachsenen Opalinen vom Froschdarm wachsen, sondern sich sehr früh teilen. Solche Teilungs-

stadien fand ich noch am 5. Tage nach der Infektion mit Cystozygoten (Taf. 13 Fig. 32). Die Maximalgröße von *Op. ranarum*, die ich 20 Tage nach der Infektion der Kaulquappen gemessen habe, beträgt nur 85 μ , während die erwachsenen eine Größe von mehr als 600 μ erreichen können. Auch ENGELMANN, der erste, der die Entwicklung in den Kaulquappen beobachtet hat, bemerkt, daß „die sehr breiten, flachen Formen, welche den ausgewachsenen Zustand der Art charakterisieren, erst im jungen Frosch auftreten“ (p. 576).

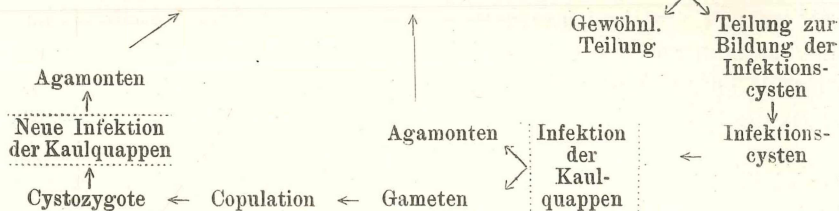
Der Entwicklungskreis von *Op. ranarum*.

Nachdem ENGELMANN zum erstenmal die Entwicklungsstadien von *Op. ranarum* in Froschlarven gesehen hatte, gelang es ZELLER die Bildung der Infektionscysten im Froschdarm, wie auch die Infektion der Froschlarven zu verfolgen. Auf diese Weise wurde der Entwicklungskreis der Opalinen im großen und ganzen bekannt. Beide Autoren haben auch Stadien der Gametenbildung beobachtet, ohne ihre richtige Bedeutung zu erkennen. Erst NERESHEIMER konnte die Gametenbildung und die Copulation bei diesen Tieren feststellen und das Schema der ganzen Entwicklung angeben. Dies Schema möchte ich nur in zwei Punkten ergänzen. Zwischen den Cystozygoten und den jungen Agamonten müssen wir in diesem Schema die Notwendigkeit einer Infizierung neuer Kaulquappen notieren; nach der Ausschlüpfung der Infektionscysten müssen wir andererseits den Weg der direkten Umwandlung der jungen Tiere in Agamonten vermerken. Auf diese Weise bekommen wir für die Kaulquappen wie auch für die Frösche zwei Wege der Entwicklung der Opalinen: einen einfachen für die ungeschlechtliche und einen anderen, verwickelten für die geschlechtliche Fortpflanzung, wie ich auf dem beigegebenen Schema darzustellen versucht habe.

Diese zwei Wege der Entwicklung haben eine große biologische Bedeutung für die Opalinen. Wird einmal eine Kaulquappe mit Cysten infiziert, die von den erwachsenen Fröschen nach außen entleert werden, kann sich das Tier von einem Teil der Parasiten, die sich direkt in junge Opalinen umwandeln, nicht mehr befreien, obwohl der andere Teil in den Geschlechtsprozeß eintritt und im Stadium der Cystozygoten den Enddarm verlassen muß. Parallel mit dem Wachstum der Froschlarve vollzieht sich auch das Wachstum und die Vermehrung der Opalinen. Beim erwachsenen Frosch nimmt die Bildung der Infektionscysten auch nicht alle Individuen von Opalina in Anspruch, so daß die Infektion des Frosches, wenn

nicht andere ungünstige Faktoren in Wirkung treten, für sein ganzes Leben sicher ist. Die Infektion der Kaulquappen mit Zygoten, die auch mit der Nahrungsaufnahme möglich ist, bringt von Zeit zu Zeit auch Geschlechtsgenerationen in die lange Kette der ungeschlechtlichen Vermehrung der Opalinen hinein.

Op. ranarum im erwachsenen Frosch → gewöhnliche Teilung



Schema des Entwicklungskreises von *Op. ranarum*.

Systematische Stellung der Opalinen.

Die Frage nach der Natur der Kerne der Opalinen ist auch mit der Frage nach ihrer systematischen Stellung verknüpft. Je nachdem ob die verschiedenen Autoren mehr Wert auf den Cilienbesatz oder auf den Mangel an Macronuclei legten, wurden die Opalinen einmal zu den Ciliaten, ein anderes Mal zu den Pläsmodromen gerechnet. LANG (26, p. 29) stellt die Gattung *Opalina* unter die Hymenostomidae, die er folgendermaßen charakterisiert: „Zellenmund stets offen; mit undulierender Membran.“ Die Opalinen aber haben bekanntlich keinen Mund, keine undulierende Membran. Die Behauptung von KUNSTLER und GINESTE, daß die Opalinen einen Mund und After besitzen, ist nicht bestätigt worden. Vielleicht haben diese Autoren die Excretionsöffnungen der Opalinen im Momente der Entleerung des Inhaltes vom Excretionsorganell gesehen (wie METCALF und ich beobachtet und abgebildet haben) und sie für eine Afteröffnung gehalten. In seinem „System der Protozoen“ betont DOFLEIN (8, p. 74), daß die Stellung der Opalinen unter den Ciliaten noch sehr unsicher ist, weil die Bewegungsorganellen der Protozoen, obwohl von gewisser Bedeutung für die Entwicklung von Wissenschaftsbeziehungen, doch nur eine sekundäre solche Bedeutung haben. Aus praktischen Gründen aber ließ DOFLEIN die Opalinen vorläufig unter den Ciliaten, „denn bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse ist es schwer, ihnen einen anderen Ort im System anzuweisen“. Und in seinem Lehrbuch der Protozoenkunde stellt

DÖFLEIN die Opalinen unter den holotrichen Ciliaten als „primitive Formen“ den „typischen Holotricha“ gegenüber.

HICKSON (16, p. 378, 404) betrachtet die Opalinen als echte Infusorien mit Macro- und Micronuclei (irrtümlicherweise hält er die Micronuclei für Macronuclei und umgekehrt) und als Familie *Opalinina* STEIN stellt er sie zu den *Hymenostomata* DELAGE. In derselben Familie erwähnt er auch die Gattungen *Hoplitophrya*, *Diskophrya* und *Opalinopsis*. HARTOG (15, p. 111, 114, 123, 145) nimmt die Opalinen aus den Ciliaten heraus und stellt sie in die Klasse der Flagellaten neben den Trichonymphen mit der Charakteristik: „Flagella short, ciliiform, uniformly distributed; nuclei very numerous, all similar.“ Die Kerne der Opalinen hält er für ähnlich den Micronuclei (p. 144). Auf Grund des von ihm entdeckten Entwicklungskreises von *Op. ranarum* und beim Mangel an Macronuclei, wie es bis jetzt allgemein angenommen wurde, schlug NERESHEIMER vor, die Opalinen zu den Plasmodromen näher zu stellen. Den Besatz von Cilien hielt er nicht für einen genügenden Grund, die Opalinen als Ciliaten zu betrachten. „Im letzteren Falle sind aber gewiß die Unterschiede, die sie von allen übrigen Vertretern der Gruppe trennen, so groß, daß sie die Aufstellung einer den Klassen der Ciliaten und Suctorien gegenüberstehenden neuen Klasse rechtfertigen würde“ (S. 34). Der Meinung von NERESHEIMER schließt sich auch HARTMANN an (13, p. 140), und zwar aus folgendem Grunde: Die Opalinen hätten nicht den dauernden somatisch degenerativen Kerndualismus in Macro- und Micronucleus, hätten auch keine Conjugation. „Hier tritt nach NERESHEIMER (1907) ein Kerndualismus nur zeitweise nach Art der Rhizopoden zutage, und vor allem ist die Art der Befruchtung eine vollständig andere, nämlich eine Microisogamie, ein besonders für Rhizopoden und Mastigophoren charakteristischer Copulationsmodus“ (p. 141)¹⁾. METCALF hob hervor, daß bei den Opalinen die generativen Chromidien, die den oben erwähnten „Kerndualismus zeitweise nach der Art der Rhizopoden“ und die Bildung von generativen Geschlechtskernen herbeiführen, nicht annehmbar sind. Deshalb hält er für unrichtig, die Opalinen den Plasmodromen zuzuteilen, und auf Grund des Baues der Cilien, des excretorischen Apparates und der Gameten rechnet er die Opalinen unter die Ciliaten.

Der Meinung von METCALF über die systematische Angehörigkeit der Opalinen kann ich mich nur anschließen und sie weiter unterstützen. Der Bau des Cilienapparates ist ein wichtiges Merk-

¹⁾ Später rechnet HARTMANN die Opalinen von neuem zu den Infusorien. (HARTMANN u. SCHILLING: Die pathogenen Protozoen, 1917, p. 127.)

mal, das auf die enge Verwandtschaft mit den Ciliaten hinweist. Der excretorische Apparat, der von METCALF bei einigen Arten entdeckt und von mir auch bei *Op. ranarum* festgestellt wurde, hat fast denselben Bau wie bei *Hoplitophrya* und *Discophrya*, und die einzelnen nichtkontraktilen Vakuolen, die während der Gametenbildung auftreten, sind dieselben, die auch bei *Opalinopsis* vorkommen. Das Wichtigste ist aber die Anwesenheit von zahlreichen Macronuclei, die sich amitotisch teilen, während der Gametenbildung degenerieren und in den Cystozygoten fehlen.

Die Eigentümlichkeiten, die die Opalinen von den übrigen Ciliaten unterscheiden, sind lediglich durch die Anpassung an das parasitische Leben zu erklären. Das Verschwinden des Mundes hat die osmotische Ernährung zur Folge. Zum Dienste dieser Ernährung ist auch das Ectoplasma gewissen Änderungen unterworfen. Da der erwachsene Wirt im Wasser nicht infiziert werden kann, mußte der Parasit die im Wasser lebenden Larven des Wirtes angreifen. So ist die Encystierung der kleinen Individuen während der Laichzeit des Wirtes entstanden, die die Kaulquappen infizieren, wobei sie sich zu gewöhnlichen Opalinen weiter entwickeln oder in den Prozeß der Gametenbildung eintreten können. Die anisogame Copulation der Opalinen hat ihre analoge unter den Ciliaten, z. B. bei den Vorticellen.

In zwei Punkten kann ich die Meinung von METCALF nicht teilen und zwar darin, daß die Micronuclei gleichzeitig auch als Macronuclei funktionieren und daß die Opalinen primitive Formen darstellen. Die Opalinen besitzen Macronuclei, deshalb kommt den Micronuclei nur jene Rolle zuteil, die sie auch bei den übrigen Ciliaten spielen. Die Anpassung an das parasitische Leben hat die Änderung des Baues herbeigeführt, wie auch die Entwicklung mit der des Wirtes in Einklang gestellt. Die Opalinen stellen also keine primitiven, sondern sekundär vereinfachte und umgeänderte Ciliaten dar.

Die natürliche Stellung der Opalinen ist die unter den Ciliaten, wo ihnen am nächsten *Anoplophrya*, *Hoplitophrya*, *Discophrya* und *Opalinopsis* stehen, mit welchen sie auch STEIN und BÜTSCHLI in eine Familie zusammengestellt haben.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

Die Resultate der angeführten Untersuchungen lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Pellicula der Opalinen ist mit Myonemen versehen, die bei den flachen Arten dem Tier die Möglichkeit geben, die einzelnen

Ränderteile verschiedenartig zu biegen, bei den cylindrischen Arten Längsleisten zu bilden. Diese Randbiegungen und Längsleisten werden abwechselnd in verschiedener Richtung gebildet und können bei den Schwimmdrehungen, die nach rechts oder nach links vollzogen werden, auch als Steuervorrichtungen dienen.

Ein Körpergerüst in Form eines Netzes von Stützfibrillen erhält die Körperform bei den Biegungen der Pellicula. Im Ruhezustande ist dieses Netz nicht gespannt; bei der Zusammenziehung der Myoneme in den verschiedenen Regionen wird auch das Gerüstnetz in den entsprechenden Richtungen gespannt.

2. Die Opalinen weisen eine starke Neigung auf, sich nach unten zu richten, die durch ihre Körperform erklärt werden kann (Geotaxis). Bei den Stadien in den Kaulquappen, die eine andere Körperform haben, fehlt diese Geotaxis vollkommen. Die Geotaxis der Opalinen im erwachsenen Frosch ermöglicht sie sich am Vorderende des nach oben gerichteten Enddarms aufzuhalten und nicht mit dem Kot entleert zu werden; aus denselben Gründen ist die Geotaxis der Kaulquappenstadien verschwunden, weil dort der Enddarm nicht nach oben gerichtet ist.

3. Das Ectoplasma der Opalinen kann homogen aussehen oder mit Vakuolen erfüllt sein je nach dem physiologischen Zustande des Tieres. Die Ectoplasmavakuolen sind Gebilde vorübergehender Natur, die nicht in Zusammenhang mit der Geschlechtsvermehrung, sondern vielmehr mit der Ernährung, zeitweise mit den Cystenbildungsprozessen stehen.

4. Die bis jetzt als „scheibenförmige Körperchen“ bezeichneten Endoplasmaeinschlüsse stellen echte Macronuclei dar. Sie besitzen eine Kernmembran, teilen sich amitotisch und degenerieren und verschwinden bei den Geschlechtsvorgängen.

5. Die bis jetzt meistens nur als „Kerne“ bezeichneten Organellen sind als Micronuclei zu betrachten.

6. Die Chromidien, die aus den Micronuclei austreten, geben keinen neuen Nucleen Ursprung, sondern sie zerfallen im Entoplasma.

7. *Op. ranarum* besitzt auch ein Excretionsorganell in Form von mehreren nicht pulsierenden Vakuolen, die gewöhnlich zu einem vielfach verzweigten Kanalnetz allmählich verschmelzen.

8. Im Entoplasma sind oft auch Excretionskörperchen, meistens in Form von winzigen Kristallen in verschiedener Menge zu finden.

9. *Op. ranarum* und *Op. dimidiata* bilden Dauercysten, wenn die Lebensbedingungen ungünstig werden. In der Natur sind Dauercysten in den gestorbenen Fröschen zu finden.

10. Die Bildung der Infektionscysten ist nicht von der Brünstigkeit des Wirtes abhängig, sondern steht wahrscheinlich mit gewissen Prozessen im Zusammenhang, die sich in den Opalinen selbst abspielen und eine Vorbereitung zur Cystenbildung darstellen. U. a. findet eine Anhäufung von Reservestoffen statt. Die Temperatur spielt dabei als Reiz nur eine Nebenrolle.

11. Neben den bekannten Infektionscysten existiert bei *Op. ranarum* auch eine zweite Sorte von Cysten, die sich im Innern der encystierten großen Opalinen bilden.

12. Bei *Op. ranarum* beobachtet man Macro- und Microgameten und anisogame Copulation. Dieser Copulation folgt das Stadium der Cystozygote, wo die Bildung des Syncarions stattfindet.

13. Die Cystozygoten werden meistens mit dem Kot hinausgestoßen. An die Kaulquappen verfüttert, geben sie den Agamonten Ursprung, die in den Kaulquappen nicht bis zur Größe der Froschopalinen heranwachsen, sondern frühzeitig mit der Teilung anfangen. Das steht mit der Geotaxis in Zusammenhang.

14. Ein Teil der Infektionscysten in den Kaulquappen tritt nicht in Gametenbildungsteilung ein, sondern wandelt sich direkt in junge Opalinen usw. Auf diese Weise wird die Infektion auch mit ungeschlechtlichen Formen gesichert.

15. Die Opalinen ernähren sich osmotisch. Manche Tatsachen weisen darauf hin, daß sie extracellulär verdauen, d. h. auf feste Nahrungspartikelchen in der Umgebung einwirken und sie in eine Form bringen können, die geeignet zur osmotischen Aufnahme ist.

16. Die von NERESHEIMER als besondere Art aufgestellte *Op. zelleri* ist nur als eine Ernährungsform von *Op. dimidiata* zu betrachten.

17. Die Opalinen sind echte Ciliaten, die durch das parasitische Leben ziemlich stark beeinflußt sind. Deshalb sind sie nicht zu den Plasmodromen näher zu stellen, wie manche Autoren versucht haben; sie haben mit den Flagellaten nichts zu tun, wie andere meinten, sondern sind als Nächstverwandte von den Ciliaten *Anoplophrya*, *Hoplitophrya*, *Discophrya* und *Opalinopsis* zu betrachten.

Anhang.

Als die vorliegende Arbeit schon druckfertig war, konnte ich mir die vorläufige Mitteilung der Untersuchungen von BRUMPT über die Opalinen verschaffen, wo einige Fragen behandelt werden, die

ich auch untersucht habe.¹⁾ Das sind: 1. die Frage nach der direkten Umwandlung der Infektionscysten in junge Opalinen ohne Gametenbildung; 2. die Frage nach der Isogamie oder Anisogamie der Opalinen und 3. die Frage nach den Cystozygoten bei *Op. ranarum*.

In den Kaulquappen fand BRUMPT einige Wochen nach der Infektion wieder Infektionscysten, die identisch mit denen bei den erwachsenen Fröschen waren. Als er diese Cysten an solche Kaulquappen verfütterte, die sie enthielten, fand er, daß die daraus entstandenen Individuen sich weiter entwickelten, ohne Gameten zu bilden. Infektionscysten habe ich in den Kaulquappen nicht gefunden. Die direkte Umwandlung der Infektionscysten, die BRUMPT bei den Kaulquappen verfolgt hat, ist dieselbe Erscheinung, die ich bei den erwachsenen Fröschen festgestellt habe. Ob es sich hier um eine Verhinderung der Infektionscysten sich geschlechtlich zu differenzieren handelt, wie BRUMPT meint, oder dies eine biologische Anpassung des Parasiten darstellt, wie ich erklärt habe, bleibt eine offene Frage.

Bei *Op. ranarum* gibt BRUMPT in einigen Worten dieselbe Anisogamie an, die ich auch ausführlich beschrieben habe und lehnt wie ich die Meinung von NERESHEIMER über die Isogamie der Opalinen ab. BRUMPT aber glaubt, daß bei den Opalinen keine Cystozygoten existieren und daß, was NERESHEIMER als solche gedeutet hat, wahrscheinlich Infektionscysten in den Kaulquappen gewesen sind. Er bemerkt auch, daß die von ZELLER und ENGELMANN beschriebenen und abgebildeten Cysten in den Kaulquappen nicht Cystozygoten, sondern wieder Infektionscysten darstellen. Dagegen muß ich aufstellen, daß es einen grundlegenden und leicht feststellbaren Unterschied zwischen beiden Sorten von Cysten gibt. Die Infektionscysten haben gewöhnlich 6 Micronuclei, deren Zahl aber zwischen 3 und 12 schwanken kann; die Cystozygoten, die viel kleiner sind, haben anfangs 2 Micronuclei, die bald verschmelzen und ein einziges Syncarion bilden. ZELLER und ENGELMANN haben Cysten mit nur einem „Kern“ (Micronucleus), d. h. Cystozygoten abgebildet; dieselben hat auch NERESHEIMER beobachtet. Ich hatte die Gelegenheit, nicht nur viele Hunderte von Cystozygoten von *Op. ranarum* zu sehen, sondern auch direkt ihre Entstehung zu verfolgen: wie ich schon erwähnt habe, schwimmt das Tier, wenn die Copulation schon vollendet ist, eine Zeitlang, hält dann an, dreht sich rasch

¹⁾ BRUMPT, E.: Cycle évolutif des Opalines. Bull. de la Soc. de Path. Exot. T. 8 1915 p. 397—403.

herum, scheidet eine Gallertmasse aus, in der die Cilien stecken bleiben, und so entsteht eine Cyste, die anfangs zwei Micronuclei besitzt.

Literaturverzeichnis.

- 1) BARFURTH, DIETRICH: Vergleichend-histochemische Untersuchungen über Glycogen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 25.
- 2) BEZZENBERGER, ERNST: Über Infusorien aus asiatischen Anuren. Arch. f. Protistenk. Bd. 30 H. 2 1914.
- 3) BÜTSCHLI, O.: Protozoa. BRONN's Klassen u. Ordn. des Tierreichs Bd. 1 1889.
- 4) CÉPEDES, CASIMIR: Recherches sur les Infusoires astomes. Anatomie, biologie, éthologie parasitaire, systématique. Arch. Zool. exp. gen. (5) T. 3 1910.
- 5) CERTES, A.: Sur la glycogénèse chez les Infusoires. C. R. Acad. Sc. Paris 1880 p. 77—80.
- 6) DOBELL, C. CLIFFORD: Physiological dégénération in Opalina. The Quart. Journ. of micr. Sci. Vol. 21 Part 4 1907.
- 7) —: Some Observations on the Infusoria parasitic in Cephalopoda. Quart. Journ. micr. Sci. Vol. 53 1909.
- 8) DOFLEIN, FR.: Das System der Protozoen. Arch. f. Protistenk. Bd. 1 H. 1 1902.
- 9) —: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena 1916.
- 10) ENGELMANN, TH. W.: Über Entwicklung und Fortpflanzung der Infusorien. Morph. Jahrb. Bd. 1 1876.
- 11) ENTZ, GÉZA: Studien über Protisten im Auftrage der Königl. Ungar. Naturw. Gesellschaft. Budapest 1888.
- 12) FAURÉ-FREMIET, EM.: Sur la structure intime du protoplasma chez les Protozoaires. C. R. Acad. Sci. Paris T. 142 1906.
- 13) HARTMANN, MAX: Das System der Protozoen. Arch. f. Protistenk. Bd. 10 H. 1 1907.
- 14) —: Die Konstitution der Protistenkerne und ihre Bedeutung für die Zellenlehre. Jena 1911.
- 15) HARTOG, MARCUS: Protozoa. The Cambridge Natural History 1909.
- 16) HICKSON, S. J.: The Infusoria or Corticata heterokaryota. Lankester, A. Treatise on Zoology Part 1 1903.
- 17) JENSEN, PAUL: Über Geotropismus niederer Organismen. Inaug.-Diss. Bonn 1892.
- 18) JENNINGS: Das Verhalten der niederen Organismen. Leipzig 1910.
- 19) KÖLLIKER: Icones histologicae. I. Bd. Der feinere Bau der Protozoen. 1864.
- 20) KUNSTLER et GINESTE: Les spérules trophoplasmiques des Infusoires ciliés. C. R. Acad. Sci. Paris T. 141.
- 21) — —: Notice préliminaire sur l'Opalina dimidiata. Bibliogr. anat. T. 10 3^e fasc. 1902.
- 22) — —: Les Cultures des Protozoaires et les variations de la matière vivante. C. R. Acad. Sci. Paris 1906.
- 23) — —: L'orientation du corps des Opalines. C. R. Soc. Biol. Paris T. 61 1906 p. 294—296.
- 24) — —: Les spérules chromophiles chez les protozoaires. C. R. Ass. Anat. T. 8 1906 p. 3—5.
- 25) — —: Contribution à la morphologie générale des protozoaires supérieurs. C. R. Acad. Sci. Paris 1906 p. 294—296.

- 26) LANG, ARNOLD: Handbuch der Morphologie der wirbellosen Tiere. Jena 1913.
- 27) LÉGER et DUBOSCQ: Notes sur les Infusoires parasites. I. Les Astomata représentés-ils un group naturel? Arch. Zool. exp. gen. 4^e Sér. T. 2, Notes et revue No. 6 1904.
- 28) — —: Notes sur les Infusoires endoparasites. Ibid. 1904 [4] Vol. 2 p. 337—356.
- 29) LINDEN, M. v.: Tentakelartige Fortsätze von *Opalina dimidiata*. Biol. Centralbl. Bd. 29 1909.
- 30) LÖWENTHAL: Das Auftreten eines micronucleusartigen Gebildes bei *Opalina ranarum*. Arch. f. Protistenk. Bd. 3 H. 3 1904.
- 31) —: Notizen über *Opalina ranarum* nebst Bemerkungen über die Unterscheidung von Erythro- und Cyanochromatin. Ibid. Bd. 13 H. 1 1909.
- 32) MAIER, HERMANN NICOLAUS: Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. Ibid. Bd. 2 H. 1 1903.
- 33) METCALF, M.: The excretory organs of *Opalina*. Part I, II. Ibid. Bd. 10 1907.
- 34) —: Studies on *Opalina* (Preliminary notice). Zool. Anz. Bd. 32 Nr. 3/4 1907.
- 35) —: *Opalina*. Its Anatomy and Reproduction, with a description of Infection Experiments and a Chromological Review of the Literature. Arch. f. Protistenk. Bd. 13 1909.
- 36) —: *Opalina mitotica*. Zool. Jahrb. (Suppl.) Bd. 15 1912.
- 37) —: Notes upon *Opalina*. Zool. Anz. Bd. 44 1914.
- 38) NERESHEIMER, EUGEN: Die Fortpflanzung der Opalinen. Arch. f. Protistenk. (Suppl. I) 1907.
- 39) —: Der Zeugungskreis von Opalinen. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morph. u. Physiol. München Bd. 22.
- 40) NUSSBAUM, MORITZ: Über die Teilbarkeit der lebendigen Materie. I. Mitteil.: Die spontane und künstliche Teilung der Infusorien. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 26 1886 p. 485—538.
- 41) PARKER and HASWELL: A Text book of Zoology. London 1897.
- 42) PFITZNER, WILH.: Zur Kenntnis der Kernteilung bei den Protozoen. Morph. Jahrb. Bd. 1 1886.
- 43) PÜTTER: Die Atmung der Protozoen. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 5 1905.
- 44) SCHNEIDER, KARL CAMILLO: Plasmastruktur und -bewegung bei Protozoen und Pflanzenzellen. Arb. a. d. zool. Inst. d. Univ. Wien u. d. Zool. Stat. in Triest Bd. 16 1906.
- 45) SCHOUTEDEN, A.: Längsteilung bei *Opalina ranarum*. Zool. Anz. Bd. 28 1905.
- 46) STEIN: Über die ihm bis jetzt bekannt gewordenen und von ihm genauer erforschten Infusorien, welche im Innern von anderen Tieren eine parasitische Lebensweise führen. Abh. d. kgl. böhm. Ges. Bd. 10 1859.
- 47) —: Über die Einteilung der holotrichen Infusionstiere. Neue Gattungen und Arten dieser Ordnung. Sitz.-Ber. d. kgl. böhm. Ges. d. Wiss. in Prag 1860.
- 48) —: Der Organismus der Infusionstiere. Bd. 2. Leipzig 1867.
- 49) TÖNNIGES: Die feineren Bauverhältnisse von *Opalina ranarum*. Sitz.-Ber. d. Ges. z. Beförd. d. ges. Naturwiss. zu Marburg Jahrg. 1898.
- 50) —: Nachtrag zu den Untersuchungen über die feineren Bauverhältnisse von *Opalina ranarum*. Ibid. Jahrg. 1899.
- 51) VERWORN, MAX: Psycho-physiologische Protistenstudien. Jena 1889.
- 52) WALLENGREN: Zur Kenntnis der Galvanotaxie. I. Die anodische Galvanotaxis. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 2.

- 53) WINTERSTEIN, HANS: Handbuch der vergleichenden Physiologie. Jena.
 54) ZELLER, ERNST: Untersuchungen über die Fortpflanzung und die Entwicklung der in unseren Batrachiern schmarotzenden Opalinen. Zeitschr. f. wiss. Zool. 1877.

Tafelerklärung.

Tafel 12.

Fig. 1—10, 12—15, 24, 26—29 sind bei ZEISS Oc. 4 Ölimmers. $\frac{1}{12}$, Fig. 11, 16—23 bei ZEISS Oc. 12 Ölimmers. $\frac{1}{12}$, Fig. 25, 30 bei LEITZ Oc. 3 Obj. 6 gezeichnet.

Fig. 1—4, 21—23: Fixierung mit FLEMMING's starker Lösung; Fig. 25—29: Fixierung mit Pikrinessigsäure; bei allen übrigen: Fierung mit Sublimatessig.

Fig. 25—29: Färbung mit Hämatoxylin nach DELAFIELD; Fig. 30: Vitalfärbung mit Gentian-Violett; bei allen übrigen: Färbung mit Eisenhämatoxylin nach DOBLEIN.

Fig. 25—30: Ausstrichpräparate; alle übrigen: Schnitte 3—5 μ dick.

Fig. 1. *Opalina ranarum*. Flächenschnitt. a Myoneme und quergestreifte Membran, in einer Fläche dargestellt; b Myoneme; c quergestreifte Membran bei genauer Einstellung.

Fig. 2 u. 3. Desgl. Querschnitt. Myoneme im Ruhestadium in verschiedener Stellung.

Fig. 4. Desgl. Kontrahierte Myonemenbündel in Querschnitt.

Fig. 5. Desgl. Körpergerüst im Ruhezustand. a Micro-, b Macronuclei.

Fig. 6. Desgl. Körpergerüst gespannt.

Fig. 7. *Opalina dimidiata*. Körpergerüst gespannt.

Fig. 8. Desgl. Körpergerüst bei Querschnitt.

Fig. 9. Desgl. Stützfasern im Ectoplasma.

Fig. 10. Desgl. Durchschnitt einer Dauercyste.

Fig. 11. *Opalina ranarum*. Stränge von osmotisch aufgenommener Nahrung (a);

b — Macronuclei.

Fig. 12. Desgl. Homogenes Ectoplasma.

Fig. 13. Desgl. Ectoplasmavakuolen mit zentral liegenden Kügelchen.

Fig. 14. Desgl. Ectoplasmavakuolen mit verlängertem (a) und an der Wand befestigten Kügelchen (b); c Macronuclei; d Micronuclei.

Fig. 15. Desgl. Flächenschnitt. Ectoplasmavakuolen mit körnigen Kügelchen (a); b Macronuclei.

Fig. 16. *Opalina dimidiata*. a—c drei Stadien der Teilung der Macronuclei.

Fig. 17. *Opalina ranarum*. a—c wie bei Fig. 16.

Fig. 18. Desgl. Verschiedenes Aussehen der Tochterkerne (Macronuclei).

Fig. 19. Desgl. Sehr verschieden große Macronuclei, die in Teilung eintreten.

Fig. 20. Desgl. Teilungsstadien der Micronuclei mit Ausscheidung von Chromidien.

Fig. 21. Desgl. Eine Chromidie, die frei im Endoplasma liegt. Macronuclei mit Körnchen.

Fig. 22. Desgl. Austreten der Chromidien aus dem Micronucleus.

Fig. 23. Desgl. Austreten und Zerfall der Chromidien im Endoplasma.

Fig. 24. Desgl. Durchschnitte durch das Excretionsorganell (a); b Macro-, c Micronuclei.

Fig. 25. Desgl. Die Hälfte einer Cyste, die Infektioncysten enthält; ausnahmsweise Bildung von vier anstatt von zwei Hüllen.

Fig. 26. Desgl. Infektioncyste mit Macro- und Micronuclei.

Fig. 27. Desgl. Macrogamet mit Micronucleus und Durchschnitte durch Excretionsvakuolen.

Fig. 28. Desgl. Cystozygote mit zwei Micronuclei.

Fig. 29. Desgl. Cystozygote mit Syncarion.

Fig. 30. Desgl. Zerfall der Macronuclei. a Macrogametocyt mit, b ohne Chromidienbildung, mit zerfallenen Macronuclei; c Microgamet mit zerfallenen Macronuclei; d Macrogametocyt im ersten Moment der Vitalfärbung; e dasselbe Individuum einige Sekunden später; f Vitalfärbung einer Infektioncyste, viele Macronuclei sichtbar; g Vitalfärbung einer Cystozygote, keine Macronuclei.

Tafel 13.

Zeichnungen nach dem Leben.

Fig. 1—4, 7b, 9—11, 14—32 sind bei LEITZ Oc. 3, Obj. 6, Fig. 5—8, 12, 13 bei LEITZ Oc. 3, Obj. 6 gezeichnet.

Fig. 1. *Opalina ranarum*. Ectoplasmavakuolen und Macronuclei bei guter Fütterung.

Fig. 2. Desgl. Verlängerte Macronuclei, Anfangsstadien der Teilung. a Macro-, b Micronuclei.

Fig. 3. Desgl. Hungerkultur. Hinterende mit vielen Excretionskörperchen im Endoplasma, mit hellem Ectoplasma und mit „Excretionsplatte“.

Fig. 4. Desgl. Hinterende. Excretionsstreifen.

Fig. 5. *Opalina dimidiata*. Encystierung.

Fig. 6. Desgl. Dasselbe Individuum später.

Fig. 7. Desgl. Dasselbe Individuum noch später (a); b ein Teil der Hülle stärker vergrößert.

Fig. 8. Desgl. Eindringen des Tieres in eine Gallertmasse zwecks Encystierung.

Fig. 9. *Opalina ranarum*. Infektioncysten. a Cilien nicht sichtbar; b Cilien wieder erschienen; c Durchbohren der Hülle durch das Tier; d leere Cystenhülle; e ausgekrochenes Tier; f ungewöhnlich große Infektioncyste.

Fig. 10. Desgl. Infektioncyste, die im encystierten, erwachsenen Tier gebildet worden ist.

Fig. 11. Desgl. Ein Teil des encystierten Tieres mit Körperstücken, die im Begriff sind, sich zu encystieren.

Fig. 12. Desgl. Einzelne Hälften von encystierten, erwachsenen Tieren; im Innern sind die Infektioncysten sichtbar.

Fig. 13. Desgl. Eine ganze Cyste vom erwachsenen Tier.

Fig. 14. Desgl. Aus gewöhnlicher Infektioncyste ausgekrochenes Tier in der Kaulquappe, die Cystenhülle auf sich tragend.

Fig. 15. Desgl. Junge Tiere in der Kaulquappe mit verschiedener Verteilung der Plasmaeinschlüsse.

Fig. 16. Desgl. Macrogametocyten. a mit Vakuolen und Excretionsstreifen; b nur mit Vakuolen.

Fig. 17. Desgl. Abnormität bei einem Macrogametocyten.

Fig. 18. Desgl. Teilung des Macrogametocyten; der Excretionsstreifen auch sichtbar.

- Fig. 19. Desgl. Macrogamet.
Fig. 20. Desgl. Microgametocyt.
Fig. 21. Desgl. Derselbe in Teilung.
Fig. 22. Desgl. Aussehen desselben bei späterer Teilung.
Fig. 23. Desgl. Letzte Teilung (a) und Bildung der Microgameten (b).
Fig. 24. Desgl. Copulation in 3 Momenten (derselben Individuen).
Fig. 25. Desgl. Verschiedene Stellung des Macrogameten bei der Copulation.
Fig. 26. Desgl. Bildung der Cystozygote.
Fig. 27. Desgl. Junge Opaline in der Kaulquappe, die direkt aus der Infektioncyste, ohne Geschlechtsvorgänge, entstanden ist; b dieselbe in Sagittalschnitt.
Fig. 28. Desgl. Wie Fig. 27, größeres Tier.
Fig. 29. Desgl. Ausschlüpfung des Agamonten aus der Zygote.
Fig. 30. Desgl. Junger Agamont (a) mit mehreren Micronuclei, der aus einer Zygote stammt; b Querschnitt desselben.
Fig. 31. Desgl. Derselbe, etwas größer, mit typischer Form und mit Micronuclei; b Sagittalschnitt.
Fig. 32. Desgl. Teilung der kleinen Agamonten in der Kaulquappe.
-

