Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Breslau.
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Doflein.)

Beiträge zur Biologie, Agglomeration und Züchtung von *Trypanoplasma helicis* Leidy.

Von
Maximilian Schindera.

(Hierzu Tafel 5 und 3 Textfiguren.)

Einleitung.

Während die den Trypanoplasmen verwandten Flagellaten, die Trypanosomen, seit den Jahren ihrer Entdeckung wegen ihrer großen Bedeutung für die Pathologie eine ungezählte Zahl von Bearbeitern sowohl der Physiologie wie der Morphologie gefunden haben, wurden die Trypanoplasmen bisher nur morphologisch gewürdigt, während über die Biologie dieser Gattung nichts oder nur wenig bekannt ist. Und doch bieten die Trypanoplasmen des Interessanten sehr viel, haben auch ein praktisches Interesse als Parasiten gewisser Nutzfische und bilden schließlich bei phylogenetischen Vergleichen für ihre Familie eine unentbehrliche Brücke; so führt z. B. eine Theorie die eingeißlichen Trypanosomen auf die Trypanoplasmen zurück, während Hartmann und Jollos die Trypanoplasmen von den Bodoniden ableiten, freilebenden Flagellaten, die ähnlich gebaut sind und sich nur durch gedrungenere Form und das Fehlen der undulierenden Membran unterscheiden.

Es erschien mir daher lohnend, die Biologie der Trypanoplasmen einer genaueren Beobachtung zu unterziehen, wobei ich gleichzeitig

einige experimentelle Untersuchungen machte. Als ich dann feststellen konnte, daß diese Flagellaten agglomerieren, habe ich dieses Phänomen ganz besonders eingehend untersucht.

Da von dieser Gattung das in den Heliciden parasitierende *Trypanoplasma helicis* Leidy sehr zahlreich vorkommt und auch leicht zu erreichen ist, wählte ich diese Art für meine Versuche.

Systematisches.

Nach der Nomenklatur von Doflein wäre die systematische Zugehörigkeit der Trypanoplasmen kurz folgende:

Stamm: Protozoa
I. Unterstamm: Plasmodroma
I. Klasse: Mastigophora
II. Unterklasse: Zoomastigina
I. Ordnung: Protomonadina
III. Familie: Herpetomonadidae
II. Unterfamilie: Bodoninae
Gattung: Trypanoplasma.

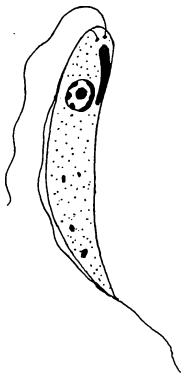
Zur Unterfamilie der Bodoninae zählt Doflein die Gattung *Bodo, Trypanophis* und *Trypanoplasma.* Zu den Herpetomonadidae gehören die Trypanosomen, so daß *Bodo, Trypanosoma* und *Trypanophis* die nächsten Verwandten der Trypanoplasmen sind.

Die Nomenklatur von Hartmann vereinigt in der Unterklasse der Flagellaten die Trypanosomen, Hämosporidien, Trypanoplasmen und andere — auch freilebende — Flagellaten zur Ordnung der Binukleaten.

Morphologisches.

Wie die morphologische Bearbeitung der ganzen Gattung *Trypanoplasma* noch ganz jungen Datums ist und zuerst von Keysselitz 1906 in Angriff genommen wurde, so beschäftigte man sich auch sehr spät mit *Trypanoplasma helicis.* Zum ersten Mal bearbeitete diese Art 1909 Friedrich, dessen Technik (Trockenausstrichmethode) jedoch unzureichend ist. Daher sind seine morphologischen Ergebnisse zum Teil falsch. Dagegen ist diese Arbeit die einzige, in der die Biologie dieses Flagellaten einige Würdigung findet. M. Kühn machte 1911 Untersuchungen über die Verbreitung der Trypanoplasmen in inländischen und ausländischen Schnecken. Eine eingehende Bearbeitung der Morphologie verdanken wir Jollos und Bělař, die das Falsche der Friedrich'schen Arbeit richtig stellten

und das Fehlende ergänzten. *Trypanoplasma helicis* hat eine ähnliche spindelförmige Gestalt wie die Trypanosomen: seitlich zusammengedrückt, das hintere Ende zugespitzt, während das vordere Körperende abgerundet ist (Textfig. A). Die Länge schwankt nach eigenen Messungen zwischen 10—20 μ, die Breite zwischen 3—5 μ. Wenn man eine dorsale und eine ventrale Kante unterscheidet, so verläuft dorsal die undulierende Membran mit der Saumgeißel (Schleppgeißel), die über das hintere Körperende bei den einzelnen Individuen verschieden weit hinausragt. Die undulierende Membran wird bei geeigneter Stellung und ruhigem Verhalten der Flagellaten sehr gut sichtbar. Ebenso wie die Saumgeißel entspringt auch die vordere Geißel (Schwimmgeißel), die immer nach hinten gerichtet ist, am vorderen Körperende.



Textfig. A.

Im homogenen Plasma sieht man im Leben mitunter noch mehr oder weniger zahlreiche stark lichtbrechende Zelleinschlüsse, bei günstiger Beleuchtung kann man auch den Kern und den Blepharoplasten durchschimmern sehen.

Die feineren Einzelheiten der Periplasten, des Kernes, Blepharoplasten sowie des ganzen lokomotorischen Apparates können nur nach Feuchtfixierung durch geeignete Färbungsmethoden sichtbar gemacht werden.

Der Periplast, die Körperhülle, ist sehr dünn und gewährt so dem ganzen Körper eine starke Metabolie, woraus wiederum eine große Formenmannigfaltigkeit resultiert. Neben der typischen langen, nach hinten zugespitzten Form finden wir daher zahlreiche Flagellaten von verschiedenster, bizarrer Gestalt.

Der Kern hat eine wechselnde Stellung, doch liegt er meist im vorderen Drittel. Er ist ein typischer Caryosomkern mit homogenem Caryosom, Kernsaftzone und Kernmembran, die eine Verdichtung des achromatischen alveolären Liningerüstes der Kernsaftzone ist. Der Kernmembran sind mehr oder weniger deutliche Chromatingranula angelagert.

Der Blepharoplast, der bei den Trypanosomen Anlaß zu weitgehenden theoretischen Auseinandersetzungen bot, und den SCHAUDINN und HARTMANN auch lokomotorischen Kern (Kinetonucleus) nennen, nimmt eine bestimmte Stellung im Körper der Trypanoplasmen ein. Er liegt ventral am Vorderende, also gegenüber der undulierenden

Membran, ist an den Periplasten eng angeschmiegt, von länglich keulenförmiger Gestalt.

Als lokomotorischen Apparat bezeichnet Bělař die Geißeln, die auch im Leben deutlich sichtbar sind, die Basalkörner (Diplosom), zwei stark färbbare Körner, aus denen die beiden Geißeln entspringen, ferner die Myoneme, am Periplast ventral verlaufende Linien, die die Kontraktionen des Körpers hervorrufen sollen, und schließlich die Crista, eine an der Basis der undulierenden Membran verlaufende Linie, die als Antagonist der Myoneme wirken soll.

Die Fortpflanzung der Trypanoplasmen geschieht wie bei allen Flagellaten durch Längsteilung. Bělař glaubt auf Grund einiger in Ausstrichen gefundener in ihren Kernverhältnissen eigenartiger Individuen an die Möglichkeit einer geschlechtlichen Fortpflanzung. Da die Untersuchungen in dieser Hinsicht sich nur auf gefärbte Flagellaten stützen, die man auch in anderer Weise deuten kann, und da ich ferner beim Suchen nach Formen, die man als Geschlechtsstadien hätte ansprechen können, stets einen negativen Erfolg hatte, dürfte eine Geschlechtsdifferenzierung wenig glaubhaft sein. Bělař selbst ist sich der geringen Beweiskraft seiner Ausführungen bewußt, da sie nur auf gefärbtem Material fußen. Solange man im Leben keine Kopulation beobachtet hat, kann man von geschlechtlichen Vorgängen nur mit Vorbehalt reden.

Zur Biologie von *Trypanoplasma helicis*.

Trypanoplasma helicis kommt im Receptaculum seminis, im Stiel des Receptaculums sowie im Penis der Heliciden zu jeder Jahreszeit vor. Im Winter befindet sich im Receptaculum eine feste, schmierige, rotbraune Substanz, die nur geringe Mengen von Flüssigkeit enthält. An der Peripherie dieser rotbraunen Substanz sitzen die Trypanoplasmen in Haufen gelagert. Im Sommer ist die Konsistenz des Receptaculuminhalts etwas weicher wegen der größeren Flüssigkeitsmenge, die ein weißes milchiges Aussehen hat. Die Trypanoplasmen dringen teilweise auch in die braune Masse ein, doch nie bis in die Mitte, weil hier offenbar die Ernährungsbedingungen ungünstiger sind.

Trypanoplasmen waren in den von mir untersuchten Weinbergschnecken, die aus der Umgegend von Breslau stammten, mit großer Regelmäßigkeit zu finden. Ich fand in 75 Proz. sehr zahlreiche Flagellaten, während in kaum 10 Proz. keine Trypanoplasmen vorhanden waren. Im Winter nimmt der Prozentsatz der infizierten Heliciden nicht ab, doch treten dann viele Degenerationsformen auf.

Die Zahl der Parasiten läßt sich mit der Größe des Receptaculums in kein Verhältnis bringen. Mitunter enthielten gerade große Receptacula keine Trypanoplasmen. Junge Schnecken haben ein kaum stecknadelkopfgroßes Receptaculum. In diesem fand ich niemals Parasiten aus Gründen, die ich später erörtern werde.

Über das Vorkommen der Trypanoplasmen in den verschiedenen einheimischen und ausländischen Schneckenarten hat M. KÜHN Untersuchungen angestellt. Er fand, daß dieser Parasit nur in Heliciden und Limnaeiden lebt. Interessant ist das Ergebnis, daß nicht in allen Gegenden die Verbreitung dieselbe ist. So fehlten die Parasiten vollständig in *Helix pomatia* der ostpreußischen Gebiete, während die süddeutschen und ungarischen Weinbergschnecken zu 100 Proz. Trypanoplasmen enthielten. Für *Helix nemoralis* gibt KÜHN ein gerade umgekehrtes Verhältnis an.

Schon aus der Verbreitung allein ergibt sich für die Frage der Pathogenität eine einwandfreie Antwort: Die Trypanoplasmen schädigen ihren Wirt nicht. An Schnitten durch das Receptaculum kann man außerdem sehen, daß durch die Parasiten keine Spur einer mechanischen Läsion des Epithels stattfindet. GELEI beschreibt eine in der Bursa copulatrix von *Dendrocoelum* parasitierende Art, *Trypanoplasma dendrocoeli*, die teilweise ein Cellularparasit ist. Dies kommt bei *Trypanoplasma helicis* nie vor. Nie konnte ich diesen Parasiten innerhalb von Zellen nachweisen.

In bezug auf die Ernährung läßt sich nur wenig sagen. Da unser Flagellat kein Cytostom besitzt, und da ferner eine Aufnahme geformter Nahrung durch irgendeine andere Körperstelle auch nicht stattfindet — jedenfalls wird geformte Nahrung nie als Einschluß des Zellplasmas gefunden — so geschieht die Ernährung offenbar durch Diffusion. Die Nahrung bilden demnach gelöste organische Stoffe, und als solche kommen für *Trypanosoma helicis* die vom Receptaculumepithel sezernierten Säfte und wahrscheinlich auch die Zerfallsprodukte der nicht befruchteten Spermatozoen in Betracht.

Die Übertragung dieses Parasiten findet, wie FRIEDRICH nachgewiesen hat, bei der Begattung statt. Ein Zwischenwirt existiert also bei *Trypanoplasma helicis* nicht. In den Nischen der Spermatophore setzen sich die Flagellaten fest und gelangen so von einem Tier aufs andere. „Es stellte sich heraus, daß die Spermatophoren in allen ihren Teilen mit Ausnahme des Schwanzfadens Trypanoplasmen enthielten.... Sie bewegten sich in den Rillen des vorderen Abschnittes frei herum, und in dem Samenpaket selber waren sie stellenweise manchmal relativ zahlreich“ (p. 30).

Ich habe die Versuche, die Friedrich anstellte, um die Übertragungsart festzustellen, nicht nachgeprüft, sondern suchte auf eine andere Weise zum Ergebnis zu kommen.

Nach den Beobachtungen von Künkel wird *Helix pomatia* erst im 4. Lebensjahre fortpflanzungsfähig; nur wenige Individuen, die im allgemeinen ein stärkeres Wachstum zeigen, werden schon früher geschlechtsreif. Wenn die Untersuchungen von Friedrich stimmten, dann durften — vorausgesetzt, daß keine germinative Übertragung stattfand — in dem Receptaculum der unausgewachsenen Schnecken keine Flagellaten zu finden sein. Da mir im Sommer und Herbst Schnecken reichlich zur Verfügung standen, habe ich darauf mein Augenmerk gerichtet und nahezu 100 junge Schnecken untersucht. Meine Überlegung bestätigte sich: nie waren bei diesen jungen Schnecken, deren Geschlechtsorgane gewöhnlich noch unentwickelt sind, die ein kaum stecknadelkopfgroßes Receptaculum besitzen, Trypanoplasmen zu finden. Eine Infektion ist eben erst im günstigsten Falle im 3. oder 4. Jahre zu erwarten.

Im Receptaculum, das, wie bereits erwähnt, einen mehr oder weniger konsistenten Inhalt hat, findet eine Bewegung kaum statt. Bei Eröffnung des Reservoirs sieht man jedenfalls vorerst keine sich bewegenden Flagellaten. Erst wenn das eröffnete Receptaculum kurze Zeit in physiologischer Kochsalzlösung — die für Trypanoplasmen isotonische Flüssigkeit — gelegen hat, kann man ein wirres Durcheinander sich äußerst stark bewegender Flagellaten beobachten.

Die Bewegung ist im allgemeinen wenig fördernd und ein äußerst komplizierter Vorgang, der bei der Schnelligkeit der Ausführung und der Kleinheit des Objekts nur schwer zu verfolgen ist. Sicherlich ist dabei in erster Linie die undulierende Membran und die Saumgeißel beteiligt. Überhaupt kann man zwei Arten von Bewegung unterscheiden:

1. Eine Bewegung wird lediglich durch Kontraktion und Streckung des Körpers hervorgerufen, wobei sich die Kontraktionen sofort über den ganzen Körper erstrecken oder aber nur über einen Teil des Körpers. Aber auch in diesem Falle schreitet meistens die Zusammenziehung weiter und dehnt sich auf den ganzen Körper aus. Die Form der Flagellaten wird dauernd verändert, sie verlieren ihren schlanken Habitus und nehmen einen bizarren an. Die Richtung dieser Kontraktionsbewegung ist keine bestimmte, sondern die Trypanoplasmen rotieren in verschiedener Richtung umher; dabei ist die Ortsbewegung nur gering. Da ich diese Form der Bewegung gerade in Präparaten beobachtete, die irgend welchen Reizen aus-

gesetzt waren, dürfte diese Bewegung eine Reizerscheinung sein. Es wäre noch die Frage zu diskutieren, wodurch die Kontraktion zustande kommt. In Anlehnung an die morphologischen Ergebnisse BĚLAŘ's könnte man annehmen, daß bei der Kontraktion die Myoneme der ventralen Seite, bei der Streckung die Crista der dorsalen Seite wirksam ist. Ob jedoch die von BĚLAŘ beschriebenen färbbaren Linien auch tatsächlich Myoneme (und nicht Periplaststrukturen) sind, ist recht fraglich. Dessen ungeachtet können wir wohl als Sitz der Kontraktilität den Periplasten betrachten.

2. Man beobachtet bei schlanken Formen eine ruhige Vorwärtsbewegung, die durch die Geißeln und die undulierende Membran hervorgerufen wird. Die undulierende Membran wird durch die Saumgeißel in wellenförmige Schwingungen versetzt, die von dem vorderen Körperende ausgehen; der höchste Wellenberg wird in der Mitte der Membran erreicht, von da nimmt die Höhe der Wellen ab. Jedoch setzen sich die Schwingungen auch auf das Ende der Saumgeißel fort. Gleichzeitig findet eine Spiraldrehung des Körpers statt, wobei die undulierende Membran wie eine Spirale um den Körper verläuft. Die vordere Geißel ist stets nach hinten gerichtet und macht peitschenförmige und schraubenförmige Schwingungen, wodurch das vordere Ende in starker zitternder Bewegung gehalten wird, während das hintere Körperende viel ruhiger ist. Die Geißelbewegung treibt das Tier immer in der Richtung des vorderen Körperendes fort; nie wird eine Rückwärtsbewegung beobachtet. Die Vorwärtsbewegung ist demnach die Wirkung der wellenförmigen Schwingungen der undulierenden Membran mit der Saumgeißel und der schraubenförmigen Bewegung der vorderen Geißel. Neben dieser schraubenförmigen aber macht die vordere Geißel noch eine peitschenförmige Bewegung, oder wie es FRIEDRICH beschreibt: „Sie schlägt von Zeit zu Zeit in derselben Ebene hin und her." Die Geißel beschreibt dabei $^1/_4$ eines Kreisbogens. Der Effekt dieser Schläge ist eine Richtungsänderung, und zwar entgegengesetzt der Geißelseite; wenn also die Geißel die peitschenförmigen Schwingungen auf der rechten Seite ausführt, so wird der Flagellat nach links abgelenkt. Die vordere Geißel besitzt also offenbar auch die Funktion eines Steuers, wie es auch bereits FRIEDRICH annimmt. WOODCOCK sieht sie als Tastorgan an, was neben den anderen Funktionen wohl denkbar ist: "At other times it seems to function rather as a sensitive organ, being repeatedly thrust out, as it were, tentatively" (p. 220).

Die beiden Arten der Bewegung, die Kontraktions- und Geißelbewegung, wechseln meist bei demselben Individuum ab.

Flagellaten, die sich eben noch durch Kontraktionen ihres Körpers fortbewegten, sich streckten und krümmten, sich wirbelnd und rotierend fortbewegten, nehmen plötzlich wieder die typische, schlanke Gestalt an und bewegen sich ruhig mit der undulierenden Membran und den Geißeln fort, ohne daß am Körper wesentliche Bewegungsveränderungen sichtbar werden.

Friedrich und Kühn geben in kurzen Worten noch eine dritte Art der Bewegung an, nämlich eine amöboide, ohne sie näher zu beschreiben. Demgegenüber habe ich Lobopodien, die für die amöboide Bewegung in Frage kommen, nie feststellen können. Bei der starken Metabolie der Flagellaten kann der erste Anblick leicht eine solche Lokomotion vortäuschen, vor allem wenn die Organismen nur geringe Vorwärtsbewegung besitzen. In diesem Falle machen die wellenförmigen Bewegungen der undulierenden Membran den Eindruck von Lobopodien. Daß dies aber nicht solche sind, geht daraus hervor, daß eine Vorwärtsbewegung in der Richtung dieser ausgestreckten „Lobopodien" nicht stattfindet. In der Tat besteht also eine amöboide Bewegung bei *Trypanoplasma helicis* nicht.

Eine häufige Erscheinung, die aber von den bisherigen Beschreibern der Trypanoplasmen noch nicht beobachtet wurde, ist die Thigmotaxis, die positive Kontaktreaktion (Jennings). Man beobachtet Flagellaten, die mit ihrem hinteren Körperende an einem Detritushaufen oder am Objektträger festliegen, während die vordere Geißel, nach hinten gerichtet, in gleichmäßigem Tempo ihre Schwingungen fortsetzt. Wenn dieses Spiel längere Zeit gedauert hat, dann reißen sich die thigmotaktischen Individuen wieder los und bewegen sich freischwimmend vorwärts.

Beim Zustandekommen dieser Reaktion scheint der physiologische Zustand der Tiere eine wichtige Rolle zu spielen; während einzelne thigmotaktisch festliegen, schwimmen andere frei herum; in manchen Stämmen sind fast alle thigmotaktisch, in anderen nur sehr wenige.

Dieselbe Reaktion kommt auch bei Zusatz von 0,01 Proz. KOH oder 0,01 Proz. HCl zustande. In letzterem Falle oder wenn der Detritushaufen klein genug ist, bewegen sich die Flagellaten mitunter im Kreise herum, wobei das Zentrum des Kreises vom hinteren Körperende gebildet wird: die ganze Schleppgeißel ist festgelegt, der hintere Körperteil ist dadurch fast ruhig, und nur der vordere Körperteil wird durch die Bewegungen der vorderen Geißel bald nach links, bald nach rechts mitgezogen.

Unter Thigmotaxis versteht Verworn „diejenigen Fälle der Barotaxis, die durch mehr oder weniger starke Berührung der

lebendigen Substanz mit festen Körpern zustande kommen" (p. 470). Er unterscheidet eine positive Thigmotaxis, ein Hinwenden zum Berührungsobjekt, das dann eintritt, wenn die Berührung eine leise, eine schwache ist, von einer negativen Thigmotaxis, die die Folge eines starken Kontaktreizes ist und sich im Fliehen vom Berührungsobjekt offenbart.

Bei Trypanoplasmen ist die positive und negative Thigmotaxis an bestimmten Körperregionen lokalisiert. Eine positive Thigmotaxis kommt nur dem Hinterende zu, während die negative ans Vorderende verlegt ist. Berührt der vordere Körperteil z. B. irgendeinen Detritushaufen, so wendet sich der Flagellat sofort in einer anderen Richtung ab. In diesem Verhalten stehen die Trypanoplasmen nicht allein da, vielmehr ist dies eigenartige Verhalten bereits bei verschiedenen anderen Flagellaten beobachtet worden. So ist auch bei *Anisonema* die Schleppgeißel positiv, die Schwimmgeißel negativ thigmotaktisch.

Die positive thigmotaktische Wirkung ist eine überaus starke. Wenn man thigmotaktische Trypanoplasmen Wärmereizen aussetzt, so wird die Thigmotaxis nur bei einzelnen aufgehoben, die meisten bleiben in diesem Zustand bis zur Wärmestarre, die bei etwa 40° C eintritt.

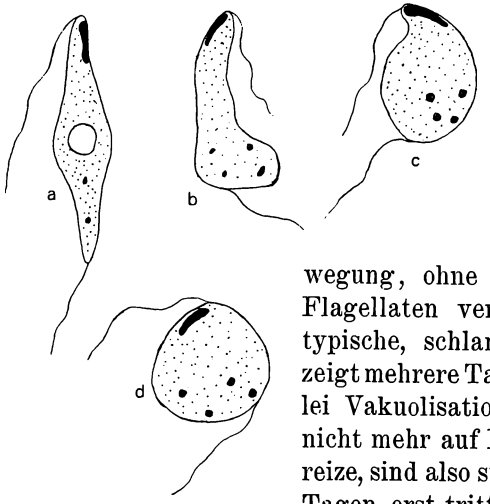
Nach PÜTTER äußert sich die positive Thigmotaxis in einer Hemmung der Geißel sowie in einer Sekretion eines klebrigen Schleims, der bei Coccidien und Gregarinen nachweisbar ist; bei Flagellaten, Rhizopoden und Ciliaten aber muß man in analoger Weise auf einen ähnlichen Vorgang schließen. Trotzdem ich bei Trypanoplasmen eine Schleimabsonderung im Leben nicht nachweisen konnte, bin ich geneigt, eine solche anzunehmen, worauf ich im Abschnitt über die morphologische Grundlage der Agglomeration noch näher eingehen werde.

Mit dem Tode der Schnecke tritt keinesfalls sofort der Tod der Trypanoplasmen ein, vielmehr vermögen diese noch weiter zu leben. So fand ich in mehreren Schnecken, deren Tod ich durch Ersticken herbeiführte, noch nach 60—70 Stunden, wo der Schneckenkörper bereits stark in Fäulnis übergegangen war, im Receptaculum lebende Flagellaten, die zuerst keine Bewegung zeigten, sondern in einer bestimmten ruhigen Lage sich befanden: Die Seite der Saumengeißel war konkav, die entgegengesetzte konvex, so daß die Tiere ein halbmondförmiges Aussehen hatten. Der Blepharoplast trat deutlicher als sonst hervor, ebenso war der Kern gut zu sehen. Dies lag offenbar an dem veränderten Lichtbrechungsvermögen des

Plasmas, das bei den meisten Trypanoplasmen stark vakuolisiert war. Auch diese stark vakuolisierten Individuen begannen nach kurzer Zeit beweglich zu werden. Die mikroskopische Untersuchung des gefärbten Präparates ergänzte die Lebendbeobachtung: Das Plasma enthielt viele kleine oder wenige große Vakuolen, der Kern erschien gebläht, die Kernmembran war gut erhalten, das Caryosom aber meist bis auf einen kleinen zentralen Restkörper aufgelöst. Geringe oder fast gar keine Veränderungen wiesen der Blepharoplast und die Geißeln auf. Die ersten Schädigungen treten also am Plasma und am Kern auf. Zahlreich sind vollkommene Degenerationsformen, bei denen vom Kern fast nichts mehr zu sehen ist, und die Bělař regelmäßig im Winter gefunden hat. Hervorgerufen wird diese hochgradige Schädigung offenbar einmal durch die fehlende Nahrung und ferner wohl in hauptsächlichster Weise durch die Fäulnis. Eine vermehrte Teilung auf Grund der ungünstigen Lebensbedingungen, wie sie bei Protozoen mehrfach beschrieben wurde, habe ich nicht feststellen können.

Außerhalb des Receptaculums zeigen sich die Trypanoplasmen nur wenig lebens- und widerstandsfähig. Wird der Receptaculuminhalt in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, so stellen die Flagellaten in mehr oder weniger kurzer Zeit zunächst ihre Vorwärtsbewegung ein, während die vordere Geißel und die Schleppgeißel noch Bewegungen ausführen. Allmählich hört auch diese Bewegung auf: die Trypanoplasmen liegen wie tot unter Beibehaltung ihrer schlanken Form am Boden. Nachdem sie sich einige Stunden in diesem Zustand befunden haben, beginnen sie sich abzukugeln. Überhaupt ist das Abkugeln die typische Veränderung beim Absterben der Trypanoplasmen. Sie verdicken zunächst ihr hinteres Ende kugelförmig, in der Mitte des Körpers tritt meist eine größere Vakuole auf, die den Periplasten auf beiden Seiten ausbuchtet (Textfig. B a u. b). Im Plasma treten stark lichtbrechende Granula auf. Je größer die kugelförmige Verdickung am Hinterende wird, desto länger wird der frei hervorragende Teil der Schleppgeißel; offenbar strebt das Plasma an der Saumgeißel entlang der Tropfenform zu (Textfig. B c u. d). Doch kann man auch beobachten — besonders wenn der Absterbeprozeß durch einen willkürlichen Eingriff hervorgerufen wird —, daß sich zunächst die Schleppgeißel ablöst und dann erst nehmen die Individuen die sphärische Form an. In diesem Falle findet auch noch eine Bewegung statt, die eine ruckweise, planlose ist. Die sphärischen begeißelten und bewegungslosen Formen können sich tagelang halten. Erst all-

mählich tritt eine Auflösung des Plasmas und der Geißeln ein. Die mikroskopische Untersuchung gefärbter Präparate dieser abgerundeten Formen ergab lediglich eine Abrundung des Blepharoplasten. Die Abrundung des Körpers beim Absterben wird sicherlich durch das Versagen der gestaltgebenden Kräfte herbeigeführt. Als solche sind anzusehen die Saumgeißel, die undulierende Membran mit der Crista und wahrscheinlich auch der Blepharoplast. Sind diese Kräfte ausgeschaltet, dann nimmt das Plasma seiner flüssigen Natur gemäß auf Grund der Oberflächenspannung eine Kugelform an.



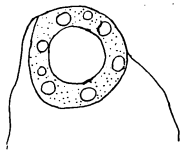
Textfig. B a—d.

Nicht immer treten diese typischen Veränderungen beim Absterben und nach dem Tode auf. Mitunter, vor allem wenn man die Trypanosomen in der feuchten Kammer hält, beobachtet man ein Aufhören der Bewegung, ohne daß sich der Habitus der Flagellaten verändert. Sie behalten ihre typische, schlanke Form bei, das Plasma zeigt mehrere Tage keine Schädigung, keinerlei Vakuolisation. Trotzdem reagieren sie nicht mehr auf Reize, z. B. auf Temperaturreize, sind also sicherlich tot. Nach mehreren Tagen erst tritt bei diesen Zerfall ein. Ich habe versucht, die Bedingungen aufzudecken, unter denen die Trypanoplasmen so lange dem Degenerationsprozeß widerstehen, jedoch mit negativem Erfolg.

Die Lebensweise bringt es mit sich, daß die Trypanoplasmen gegen Eintrocknung sehr empfindlich sind. Beim Eintrocknen wird das Plasma heller, deutlich tritt der Periplast als seitliche Kontur hervor. Durch das Andrücken an den Objektträger werden die schlanken Flagellaten wesentlich breiter. Solange noch geringe Mengen von Flüssigkeit vorhanden sind, bewegen sie die Geißeln. Besonders schön sind die Wellen der undulierenden Membran zu beobachten und die langsam verlaufenden Kontraktionen und Streckungen des Körpers. Allmählich vermag sich der Parasit nicht mehr zu strecken, er gibt die Geißelbewegung auf und nimmt eine runde Gestalt an. Bald treten Vakuolen im Körper auf. In der Körpermitte tritt eine größere Vakuole deutlich hervor, an deren Rand der Kern sichtbar ist. Immer weiter dehnt sich die zentrale Vakuole

aus und drängt das Plasma an den Periplasten, so daß bald der Körper die Form eines Ringes erhält. In dem peripher gelegenen Plasma sind noch kleinere Vakuolen vorhanden, so daß das Plasma selbst nur noch Brücken zwischen diesen bildet (Textfig. C). Am längsten widersteht der Auflösung der Periplast.

Die Beobachtung des Lebens im Kadaver sowie der Reaktion auf Eintrocknung habe ich deshalb so genau gemacht, um einer eventuellen Encystierung auf die Spur zu kommen. Während im Sommer das Receptaculum wenigstens einige Tropfen Flüssigkeit enthält, ist es im Winter manchmal von geradezu harter Konsistenz, da die Sekretion im Receptaculum, die vorwiegend während der Begattungszeit stattfindet, im Winter ganz versiegt. Und bei den Protozoen ist es ja eine weit verbreitete Erscheinung, daß sie sich gegen Trockenheit sowie gegen andere ungünstige Lebensbedingungen durch Encystierung schützen. Dies ist bei *Trypanoplasma helicis* nicht der Fall. Friedrich und Kühn hatten im Winterreceptaculum einige Formen ohne Blepharoplast und ohne Geißeln gefunden. Ausdrücklich hebt jedoch Kühn hervor, daß er bei keiner der von ihm gefundenen geißellosen „Dauerformen" eine Cystenhülle nachweisen konnte. Diese Formen können daher wohl nicht als Dauerformen angesprochen werden, da sie durch das Fehlen von Geißeln und Blepharoplast für das Durchhalten bei ungünstigen Bedingungen durchaus nicht günstiger gebaut sind. Im übrigen konnte ich unter den Formen, die ich vorher als Abkugelungs- und Degenerationsstadien beschrieb, mehrfach solche beobachten, die ihre Geißeln abgeworfen hatten, und in deren Körpermitte ein stark färbbares Granulum sichtbar war, was wahrscheinlich das gequollene Caryosom war. Nie gelang mir aber der Versuch, aus diesen Formen wieder typische Flagellaten zu züchten, wodurch erst der definitive Beweis erbracht wäre, daß dies Dauerformen sind.



Textfig. C.

Auch bei Trypanosomen hat man ähnliche Formen als Cysten oder Dauerformen ansprechen wollen; aber allmählich kam man doch darauf, daß dies Degenerationsstadien sind. Bei Trypanoplasmen wird die Deutung dieser geißellosen und blepharoplastlosen Formen dieselbe sein. Nötig ist jedenfalls eine Dauerform nicht. Viele Flagellaten gehen wohl während des Winters zugrunde, was man aus den zahlreichen Degenerationsstadien ersehen kann, aber selbst wenn das Receptaculum noch so sehr ausgetrocknet ist, dann findet man doch einige Trypanoplasmen, die die schlanke Gestalt

besitzen und frei beweglich sind. Anspruchslos genug wird wenigstens eine geringe Anzahl den Winter überdauern, um dann im Sommer unter günstigeren Bedingungen durch vermehrte Teilung den Verlust wieder gut zu machen.

Da die Trypanoplasmen frei beweglich sind, war eine Orientierung zum Schwerkraftreiz zu erwarten. Die Geotaxis ist eine Reaktion, die leicht durch andere Reaktionen verdeckt wird. „In deutlicher Weise tritt sie nur dann ein, wenn andere wirksame Reize völlig fehlen, und in solchen Fällen, wo sie mit anderen Reaktionen interferiert, ist es gewöhnlich die Schwerkraftreaktion, die den anderen weicht." Um alle Fehler auszuschalten, habe ich diese Reaktion stets mit frischem Material und ganz sauberen Röhrchen bei Ausschaltung jeder Lichtwirkung gemacht. Es erwies sich, daß die Trypanoplasmen positiv geotaktisch sind. Stets befanden sich die Flagellaten auf dem Boden des Glases und auch dann, wenn das Glas mit der Öffnung nach unten aufgestellt wurde, sammelten sie sich am unteren Ende. Daraus geht zugleich hervor, daß eine Reaktion auf Luftsauerstoff in positivem oder negativem Sinne nicht besteht. Jede Wasserströmung vermag aber die positive Geotaxis aufzuheben, und lange Zeit konnte ich zu keinem Resultat gelangen, weil ich dies außer acht ließ. Ebenso ist es von Wichtigkeit, ganz saubere Röhren zu verwenden, um die Fehlerquellen, die durch Thigmotaxis entstehen könnten, auszuschalten. Weil aber gegen diesen Versuch in der Glasröhre der Einwand erhoben werden kann, daß die Trypanoplasmen in geschwächtem Zustand einfach auf den Boden des Glases sanken, oder aber, daß das spezifische Gewicht der Flagellaten das Ansammeln am unteren Ende des Glases bewirkte, so suchte ich durch direkte Beobachtung der geotaktischen Bewegung zu einem einwandfreien Ergebnis zu kommen und stellte folgende Versuche an:

1. In einem Präparat wird das Deckgläschen durch einen 1 mm dicken Glasfaden unterstützt. Die Trypanoplasmen sammeln sich am Objektträger und bewegen sich hier äußerst lebhaft; nur vereinzelte Flagellaten schwimmen an der Oberfläche.

2. In einem Präparat wird in gleicher Weise das Deckgläschen unterstützt, und zunächst beobachtet man im vertikalen Mikroskop. Nunmehr wird das Mikroskop horizontal gestellt, so daß das Präparat vertikal steht. Verfolgt man jetzt die Bewegungsrichtung, so sieht man, wie sich die Mehrzahl der Trypanoplasmen sofort mit dem Vorderende nach unten wendet (im mikroskopischen Bilde umgekehrt) und nach dem unteren Ende des Präparates schwimmt. Stoßen die Fla-

gellaten auf irgendeinen Widerstand, so treten Kontraktionsbewegungen auf, die Richtung wird geändert, und jetzt schwimmen sie kurze Zeit nach dieser falschen Richtung. Bald jedoch ändern sie wiederum die Richtung, bis ihr Vorderende nach dem unteren Rande des Präparates zeigt. Nunmehr schwimmen sie längere oder kürzere Zeit nach unten zu, bis sie wieder irgendein Widerstand zur Richtungsänderung zwingt. Nach zwei Stunden haben sich fast alle Trypanoplasmen im untersten Drittel des Präparates angesammelt.

Durch diese zwei Versuche ist erwiesen, daß tatsächlich bei *Trypanoplasma helicis* eine negative Geotaxis besteht.

Eine Ablenkung der Geotaxis durch Lichtwirkung habe ich nicht feststellen können. Überhaupt verhalten sich die Trypanoplasmen wie alle parasitischen Protozoen gegen Licht vollkommen indifferent. Es war für den Lebensprozeß gleichgültig, ob ich die Kulturgläschen im Dunkeln oder im Hellen hielt. Auch auf dem Objektträger im Brennpunkt künstlicher Belichtung zeigten sie keinerlei Reaktion oder Schädigung, so daß sie gegen Licht sicherlich unempfindlich sind.

Gegen Wasserströmungen zeigen die Trypanoplasmen eine bestimmte Reaktion: sie stellen sich mit dem vorderen Körperende gegen den Strom, sie sind also positiv rheotropisch. Zur Prüfung dieser Reaktion verwandte ich zwei Methoden:

1. Durch Anhalten von Fließpapier an die eine Seite des Deckglases erzeugt man eine geringe Strömung.

2. In einer in der Mitte verjüngten Glasröhre wird durch Druck auf die an den Enden angebrachten Gummikappen ein schwacher Strom hervorgerufen. Beide Methoden geben für Trypanoplasmen gleich gute Resultate. Entsteht eine geringe Strömung, so wenden sich sofort die Flagellaten mit ihrem vorderen Körperende gegen den Strom. Hier und da sieht man Individuen, die mit dem Strom schwimmen. Da dies nur bei vereinzelten Trypanoplasmen zu beobachten ist, sind es offenbar geschwächte Flagellaten, die nicht mehr gegen den Strom anzukämpfen vermögen und mitgerissen werden, was auch daraus erhellt, daß man diese Reaktion bei allen Parasiten hervorrufen kann, wenn man die Strömung verstärkt; dann werden sie vom Strom mitgezogen und schwimmen mit dem vorderen Körperende mit der Strömung. In diesem Verhalten des positiven Rheotropismus gleichen die Trypanoplasmen ganz den Trypanosomen und Paramäcien.

Wie die Wimpern bei *Paramaecium*, so ist auch bei *Trypanoplasma helicis* die vordere Geißel nach hinten gerichtet und daraus

folgt die Einstellung zum Strom: damit kein mechanischer Widerstand entsteht, wenden sie sich mit dem vorderen Körperpol gegen den Strom, so daß die Geißel ungehindert weiter ihre schraubenförmigen Bewegungen vollführen kann. So ist also auch hier der Rheotropismus anzusehen als „eine Antwort auf die ungewöhnlichen Verhältnisse in der Umgebung, der bezweckt, die normalen Beziehungen wieder herzustellen" (JENNINGS, p. 113).

Die Agglomeration von *Trypanoplasma helicis*.

1. Allgemeines und Physiologie der Agglomeration.

Bei meinen Versuchen, die Trypanoplasmen in verschiedenen eiweißhaltigen Medien zu kultivieren, machte ich die Beobachtung, daß sie in gewissen Sera agglomerieren.

Zur Beobachtung der Agglomeration kann man sich dreier Methoden bedienen: 1. Die mikroskopische Beobachtung unter dem Deckglas. Dies ist die vorteilhafteste Methode, weil man wenig Material braucht, und weil man ferner den ganzen Vorgang, besonders in seinem Beginn, genau beobachten kann; 2. die Beobachtung im Blockschälchen mit schwachem Objektiv; 3. die makroskopische Beobachtung in der Eprouvette. Die Agglomerate setzen sich als feine weiße Knötchen am Glasrand fest, während die nicht agglomerierten Flagellaten sich auf dem Boden des Glases sammeln. Diese Methode, die bei der Bakterienagglutination fast ausschließlich Verwendung findet, hat bei Trypanoplasmen verschiedene Nachteile, vor allem den, daß man zuviel Material verbraucht. Ferner ist man nie in der Lage, die Agglomeration festzustellen, wenn sie nur in geringem Maße stattfindet.

Die Agglomerationversuche führte ich derart aus, daß ich zu einem Tropfen trypanoplasmenhaltiger physiologischer Kochsalzlösung einen Tropfen des Serums von bestimmter Konzentration hinzugab. Das Deckglas wurde durch einen 1 mm dicken Glasfaden unterstützt, um die freie Bewegung der Flagellaten zu gewährleisten. Beobachtet wurde nur mit schwachen Objektiven, weil bei stärkeren Systemen die Übersicht verloren geht und die Anfänge der Agglomeration leicht der Beobachtung entgehen.

Stellt man auf diese Weise unter Zusatz von Pferdeserum ein Präparat her, dann sieht man zunächst, daß die Trypanoplasmen ihre Bewegung stark beschleunigen. Noch in der ersten Minute legen sich die Flagellaten paarweise mit dem hinteren Körperende aneinander, und nachdem sie sich berührt haben, streben sie wieder

voneinander fort, ohne daß der einmal gewonnene Kontakt verloren geht. Es gesellen sich zu den Paaren neue Flagellaten hinzu, so daß ein Gebilde entsteht, das an einen Morgenstern erinnert, dessen Strahlen beweglich sind. Die Bewegung der Trypanoplasmen bleibt nämlich bei diesem Vorgang erhalten; immer wieder versuchen sie mit nach rückwärts geschlagener Vordergeißel sich loszureißen, was ihnen jedoch nicht gelingt. Durch die Bewegungen der Vordergeißel wird das sternförmige Gebilde bald hierin bald dahin gezerrt. Wie von einer unsichtbaren Kraft werden immer mehr Parasiten in den Verband hineingezogen, neue Individuen legen sich an der Peripherie fest. Noch vermag man in den Agglomerationshaufen die einzelnen Individuen zu erkennen; doch die Zusammenballung geht weiter, so daß in der Mitte die Lebensbedingungen immer ungünstiger werden und die zentral gelegenen Trypanoplasmen dem Tode verfallen. In der Mitte der Agglomerate entsteht — offenbar durch Lösung der Körper — ein feiner, matter, granulierter Detritus. An der Peripherie der durch das Absterben der zentralen Flagellaten gebildeten Rosette, die bald 50—100 Individuen umfaßt, bewegen sich die Trypanoplasmen lebhaft weiter. Die kleinen Rosetten vereinigen sich meist miteinander zu größeren.

Dies ist etwa das Bild, das sich bietet, wenn man Pferdeserum in einer Verdünnung von 1 : 25 zu den Trypanoplasmen hinzufügt. In schwächeren Konzentrationen tritt die Agglomeration erst allmählich auf, und es bilden sich dann nur kleine Rosetten, die getrennt bleiben. Daneben aber bleiben stets verschiedene Flagellaten frei beweglich.

Die Agglomeration der Trypanoplasmen findet ihre Parallele in der Agglomeration der Trypanosomen und Spirochäten, die Laveran et Mesnil, Francis, Jürgens, v. Prowazek, Manteufel, Düring und andere beschrieben und näher studiert haben.

Laveran et Mesnil machten als erste die Entdeckung, daß *Trypanosoma lewisi*, im Eisschrank aufbewahrt, agglomeriert. Sie identifizieren diesen Vorgang mit der Agglutination der Bakterien und nennen die Zusammenballung der Trypanosomen bald Agglomeration bald Agglutination. Die Trypanosomen agglomerieren mit dem hinteren geißellosen Ende. Die Autoren stellen auf Grund ihrer Untersuchungen fest, daß die Trypanosomen 1. im Rattenserum, das durch Infektion immun geworden ist, 2. im normalen Serum von Kaninchen, Hunden, Schafen, Pferden und Hühnern agglomerieren.

v. Prowazek beobachtet die Agglomeration bei *Trypanosoma lewisi* und *brucei* in Kulturröhren, die er 14 Tage bei Zimmer-

temperatur hielt. Da in dem Ausstrichpräparat der agglomerierten Trypanosomen der Blepharoplast deutlich zerfallen ist, so ist PROWAZEK der Ansicht, daß „durch Austritt der Blepharoplastsubstanz und ihre Verquellung eine Klebrigkeit des den Blepharoplast einschließenden Zellenendes herbeigeführt wird, die erst die Agglomeration ermöglicht“ (p. 364).

Bei der Agglomeration beobachtet er am Körperende den Austritt „minutiöser Körperchen“; im gefärbten Präparat stellt er ferner einen „Schleimhauch“ fest.

Agglomeration erzielt er auch durch Zusatz von Brillantkresylblau.

MANTEUFEL stellt fest, daß die Agglomeration der Trypanosomen nicht der Agglutination der Bakterien auf Grund wesentlicher Unterschiede gleichgestellt werden darf.

DÜRING erzielte Agglomeration durch Zusatz von Methylenblau, von schwacher Salzsäure, von Galle und von 1 Proz. Kochsalzlösung.

Über Agglomeration bei Trypanoplasmen wurden bisher, soweit ich die Literatur übersehe, noch keine Untersuchungen angestellt.

KÜHN gibt an, daß er eine solche nicht beobachtet hat. WOODCOCK schließt in seiner Zusammenfassung über die Blutflagellaten, wobei er auch das im Fischblut parasitierende *Trypanoplasma borreli* einer Würdigung unterzieht, von den Trypanosomen auf eine Agglomeration der Trypanoplasmen: “Agglomeration has not, up till now, been observed in Trypanoplasma, but there can be little doubt that, if it occurs, it will be found to take place there also by the anterior end” (p. 224). Damit zieht er allerdings einen falschen Schluß, da die Trypanoplasmen mit dem hinteren Ende agglomerieren.

Es liegt nahe, die Erscheinung der Agglomeration, die im Grunde genommen eine Zusammenballung ist, der Agglutination der Bakterien, die in der Bakteriendiagnose eine eminent wichtige Rolle spielt, gleichzustellen.

„Das Phänomen der Agglutination besteht in einer Verklumpung der in einer Flüssigkeit (Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung) frei suspendierten Bakterien bei Zusatz von homologem Immunserum und in ihrer Immobilisierung, sofern dieselben beweglich sind“ (PALTAUF, p. 487). Das Wesentliche bei der Agglutination ist also die Verklumpung mit gleichzeitiger Immobilisierung. Schon in diesen wesentlichen Punkten unterscheidet sich die Agglomeration der Trypanoplasmen und Trypanosomen von der Agglutination. Die Beweglichkeit bleibt den Trypanoplasmen erhalten, was man am besten durch verdünnte Sera zeigen kann. In diesen bewegen die

agglomerierten Trypanoplasmen die vordere Geißel noch nach 24—36 Stunden. Bei der Agglutination dagegen stellen die Bakterien sofort nach Zusatz des Serums ihre Bewegung ein, „sie erscheinen wie in einem unsichtbaren Medium erstarrt“ (Paltauf, p. 488). Ferner geht die Zusammenballung bei Trypanoplasmen nicht regellos vor sich, es ist keine Verklumpung wie bei den Bakterien, sondern die Flagellaten legen sich mit dem hinteren Körperende aneinander, wobei das Bild einer Rosette entsteht.

Voraussetzung für die Agglomeration ist die Vitalität und die freie Beweglichkeit der Trypanoplasmen. Um mich davon zu überzeugen, ob die Agglomeration an die Vitalität gebunden ist, machte ich folgenden Versuch: ich erwärmte Trypanoplasmen im Thermostaten auf dem Objektträger bis auf 45°, wobei sie abstarben, aber ihre schlanke Form bewahrten. Dann setzte ich Serum in wirksamer Konzentration hinzu. Das gleiche Serum setzte ich zu Trypanoplasmen, die mit Formaldehyd abgetötet waren. Um aber stärkere Schädigungen durch den Formaldehyd zu vermeiden, setzte ich ihn in ganz schwacher Konzentration hinzu, so daß dieser in der trypanoplasmenhaltigen Kochsalzaufschwemmung höchstens in einer Konzentration von 0,4 Proz. enthalten war. In keinem Präparat, in dem sich auf diese beiden Methoden abgetötete Trypanoplasmen befanden, trat Agglomeration ein, während im Kontrollpräparat lebende Flagellaten kurze Zeit nach Zusatz des Serums Rosetten bildeten. Den Versuch mit Trypanoplasmen, die mit Formaldehyd abgetötet waren, machte ich deshalb, weil Laveran et Mesnil angeben, daß sie auch mit Trypanosomen, die auf diese Art abgetötet waren, Agglomeration erzielten, doch keine mit typischer Rosettenbildung, sondern mit unregelmäßiger Anordnung der Flagellaten. Dies kann man übrigens auch bei Trypanoplasmen erreichen, wenn man statt der mikroskopischen die makroskopische Agglomerationsmethode wählt. Jedoch ist diese Verklumpung nicht als Folge der Serumwirkung anzusehen, da sie auch im Kontrollgläschen auftritt, das mit toten Trypanoplasmen ohne Serum angesetzt wird. Bei der Sedimentierung verfangen sich die toten Flagellaten und bilden dann die unregelmäßigen Klumpen. Durch diese Versuche ist erwiesen, daß eine Grundvoraussetzung für das Eintreten der Agglomeration das Lebendigsein der Trypanoplasmen ist.

Schon die Beweglichkeit der Parasiten ist für das Zustandekommen des Phänomens ausschlaggebend. Trypanoplasmen, die nur geringe Bewegung zeigen, agglomerieren weit schlechter als gut bewegliche. Bei der Agglutination der Bakterien dagegen spielt

weder die Beweglichkeit noch die Lebensfähigkeit eine wesentliche Rolle. Auch unbewegliche und tote Bakterien können agglutinieren.

Wichtig für den Unterschied zur Agglutination ist ferner die Beobachtung der Desagglomeration, die auch LAVERAN et MESNIL u. MANTEUFEL an Trypanosomen gemacht haben, die aber bei der Bakterienagglutination nicht vorkommt. Gerade bei den Grenzwerten, bei denen eben noch Agglomeration zustande kommt, kann man vielfach sehen, daß, nachdem längere Zeit Agglomerate bestanden haben, sich diese wieder lösen und alle Individuen ihre freie Beweglichkeit erlangen. Für Trypanosomen beschreiben LAVERAN et MESNIL diesen Vorgang folgendermaßen: „On est frappé vivement, quand on examine certaines gouttes pendantes qui avaient présenté une agglutination (agglomeration) bien nette peu après le mélange de sérum et de sang virulent, de constater, vingt-quatre ou même un petit nombre d'heures plus tard, que le gros amas secondaires, s'ils existaient, se sont disloqués, que le nombre de rosaces a beaucoup diminué, que chacune d'elles se compose de moins d'individus, et qu'enfin les trypanosomes isolés sont fortement augmenté; il peut arriver même que certaines gouttes pendantes ne montrent plus d'agglutination du tout" (p. 941).

In folgenden wesentlichen Punkten unterscheidet sich also die Agglomeration der Trypanoplasmen von der Agglutination der Bakterien:

Agglomeration	Agglutination:
1. Zusammenballung findet in bestimmter Ordnung statt in Form von Rosetten.	1. Unregelmäßige Verklumpung zu Haufen.
2. Die Bewegungsmöglichkeit wird nicht gehemmt.	2. Agglutination und Immobilisierung treten zugleich auf.
3. Voraussetzung ist freie Beweglichkeit und Vitalität der Trypanoplasmen.	3. Auch unbewegliche und tote Bakterien agglutinieren.
4. Desagglomeration kommt vor.	4. Eine Desagglutination ist nie beobachtet worden.

Verschiedentlich wird das Phänomen der Zusammenballung bei Trypanosomen noch Agglutination genannt, obwohl offenbar, wie es auch MANTEUFEL nachgewiesen hat, die gleichen Unterschiede zur Agglutination der Bakterien bestehen wie bei den Trypanoplasmen. Es ist vollkommen berechtigt, diese Erscheinung bei Trypanoplasmen und Trypanosomen Agglomeration zu nennen, um jegliche falsche Vorstellung, die durch den Namen Agglutination entstehen könnte, zu vermeiden.

Meine Untersuchungen erstreckten sich auf die nicht spezifische Agglomeration, die also hervorgerufen wird durch normale Sera. Im Gegensatz dazu nennt man spezifische Agglomeration diejenige, die durch Immunsera verursacht wird. Um über die Natur des im Serum wirksamen Stoffes Aufschluß zu gewinnen, versuchte ich festzustellen, in welchen Konzentrationen die Sera wirksam sind, durch welche Temperatur ihre Wirksamkeit aufgehoben wird, ob die Temperatur auf die Agglomerationsintensität einwirkt und ob die agglomerierende Kraft durch Eintrocknen des Serums erhalten bleibt.

Wesentlich für das Gelingen der Versuche ist, daß das Trypanoplasmamaterial vollkommen einwandfrei, stark beweglich und zahlreich ist. Versuche mit halbtotem Material mißlingen stets, weil eben eine Voraussetzung der Agglomeration die Vitalität ist. In physiologischer Kochsalzlösung leidet die Bewegungsmöglichkeit schon nach wenigen Stunden. Es ist daher notwendig, stets mit frischem Material die Versuche vorzunehmen.

Nicht weniger wichtig ist die Zahl der Trypanoplasmen. Befinden sich zu wenig Flagellaten unter dem Deckglas, so ist einmal die Beobachtung sehr erschwert, außerdem kann bei der wenig fördernden Bewegung ein Zusammentreffen nur allmählich zustande kommen.

Untersucht wurden Pferde-, Schweine-, Hunde-, Rinder-, Kälber-, Hammel-, Ziegen-, Hecht- und Menschenserum, die alle Agglomeration hervorriefen. Anodonta- und Schneckenblut sowie steriles und in Fäulnis übergegangenes Weißei vom Hühnerei hatten keine agglomerierende Kraft. Meine Beobachtungen dehnten sich im allgemeinen auf 2—3 Stunden aus; dann legte ich die Objektträger in die feuchte Kammer und sah nach 12 Stunden noch einmal nach.

Da sich das Zählen der Rosetten in bestimmten Zeitabschnitten sowie das Messen der Agglomerate als zeitraubend und unrichtig erwies, habe ich es unterlassen.

Alle Versuche wurden mit reinen Sera gemacht, d. h. ich setzte nie desinfizierende Mittel hinzu, um Fehler zu vermeiden. Die Verdünnungen wurden so hergestellt, daß die Aufschwemmungsflüssigkeit der Trypanoplasmen zusammen mit dem Serum in bestimmter Konzentration die Verdünnung ergab. Verdünnt wurde das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung.

Stets ist es nötig, ein Kontrollpräparat ohne Zusatz von Serum anzufertigen, um Verwechslungen mit Spontanagglomeration, auf die ich später eingehen werde, zu vermeiden.

Ich lasse nunmehr einige Protokolle folgen:

1. Pferdeserum:

1 : 1. Stark bewegungshemmende Wirkung, die zur Bewegungslähmung führt. Nach 3 Minuten beginnt die Degeneration, die mit Abrundung der Trypanoplasmen endet. Nach 5—10 Minuten sind alle Individuen abgerundet. Agglomeration kam nicht zustande.

1 : 1 (30 Minuten auf 64°—67° erwärmt). Allmählicher Beginn der Agglomeration. Nach 30 Min. wohl ausgebildete Rosetten. Die Bewegung hält noch mehrere Stunden an.

1 : 20. Die Agglomeration setzt sofort ein, zugleich aber auch die Paralyse, die nach 15 Min. die Abrundung der Flagellaten zur Folge hat.

1 : 20 (30 Min. 64°—67°). Noch nach 60 Min. ist keine Agglomeration zu beobachten. Nach 12 Stunden sind einige kleine Rosetten sichtbar.

1 : 100. Nach 5 Min. Morgensternbildung, die weiter fortschreitet, so daß nach 10 Min. Rosetten vorhanden sind. Nach 18 Stunden an der Peripherie der Rosetten bewegliche Trypanoplasmen.

1 : 100 (30 Min. 64°—67°). Keine Spur von Agglomeration zu beobachten.

1 : 200. Nach 20 Min. Sterne zu 5 Individuen. In der Folgezeit bilden sich kleinere Rosetten, die sich nicht vereinigen, sondern getrennt bleiben.

1 : 400. Nach 15 Min. sind einzelne mit den Körperenden vereinigte Paare zu sehen.

1 : 500. Keine Agglomeration.

2. Schweineserum.

1 : 1. Baldiger Beginn der Agglomeration, wobei zunächst längere Ketten, dann Büschel und schließlich Rosetten gebildet werden. Nach 20 Min. an der Peripherie noch Bewegung. Nach 30 Min. sind alle Flagellaten abgerundet.

1 : 1 (30 Min. 64°—67°). Im Anfang ist gegenüber dem vorigen Präparat kein Unterschied. Die Agglomeration führt zu großen Rosetten. Nach 3 Stunden sind hier noch keine Zeichen von Paralyse zu sehen; fast alle Flagellaten sind beweglich.

1 : 20. Nach wenigen Minuten beginnt die Agglomeration; es werden große Rosetten gebildet. Nach 70 Min. an der Peripherie bewegliche Flagellaten. Nach 12 Stunden sind die meisten abgerundet, nur noch wenige zeigen Bewegung.

1 : 20 (30 Min. 64°—67°). Nach 10 Min. ist noch keine Agglomeration zu sehen, die sich auch später nicht ausbildet.

1 : 100. Während nach 10 Min. noch alle frei beweglich sind, bilden sich nach 20 Min. Morgensterne zu 6—10 Flagellaten. Zur Ausbildung größerer Rosetten kommt es nicht.

1 : 100 (30 Min. 64° - 67°). Keine Agglomeration.

1 : 200. Nach einigen Minuten legen sich einige Trypanoplasmen aneinander, die sich bald wieder trennen.

1 : 400. Keine Agglomeration.

3. Hundeserum.

1 : 1. Die Agglomeration beginnt sofort nach Zusatz des Serums. Es bilden sich Rosetten von 10—15 Individuen. Bald setzt die paralysierende Kraft des Serums ein und führt in 5—6 Min. zur Abkugelung der Flagellaten, wobei sie bewegungslos werden.

1 : 1 (30 Min. 64°—67°). Allmählicher Beginn der Agglomeration, die nach 10—15 Min. zur Bildung größerer Rosetten führt. Nach 2 Stunden ist noch starke Bewegung an der Peripherie der Rosetten vorhanden, die allmählich erlahmt, aber nach 12 Stunden noch schwach vorhanden ist.

1 : 20. Baldige Agglomeration; große Rosetten. Nach 60 Min. sind fast alle abgekugelt.

1 : 20 (30 Min. 64°—67°). Nach 5 Min. sind einige Paare sichtbar; der größte Teil ist jedoch frei beweglich. Dies bleibt auch so in der Folgezeit.

1 : 100. Nach 5 Min. Morgensternbildung; größere Rosetten kommen nicht zustande.

1 : 100 (30 Min. 64°—67°). Nur vereinzelte Paare sind sichtbar.

1 : 200. Nach 10 Min. ist geringe Agglomeration zu beobachten. Einzelne Individuen legen sich aneinander, die sich bald wieder trennen.

1 : 400. Keine Agglomeration.

4. Rinderserum.

In den beiden folgenden Protokollen wird die Wirkung desselben Serums auf Trypanoplasmen zweier verschiedener Schnecken, also auf zwei verschiedene Trypanoplasmenstämme dargestellt. Beide Versuche fanden zu gleicher Zeit unter den gleichen Bedingungen statt.

a) Trypanoplasmenstamm 1.

1 : 1. Sofortiger Beginn der Agglomeration, wobei zunächst Ketten und dann typische Rosetten gebildet werden. Die Bewegung läßt bald nach. Nach 10 Min. sind alle Flagellaten abgerundet.

1:1 (30 Min. 64°—67°). Die Agglomeration setzt wesentlich später ein als im vorhergehenden Falle; die Rosetten werden jedoch größer und zwar deshalb, weil eine Bewegungslähmung mit Paralyse nicht auftritt.

1:20. Bildung größerer Rosetten. Nach 30 Min. sind alle Flagellaten abgerundet.

1:20 (30 Min. 64°—67°). Auch hier kommt es allmählich zur Agglomeration, die aber viel langsamer als vorher eintritt und nicht die Intensität wie in dem Präparat mit nicht erwärmtem Serum erreicht. Nach 2 Stunden sind noch viele frei bewegliche Trypanoplasmen sichtbar.

1:100. Nach 15 Min. typische große Rosetten.

1:200. Nach 15 Min. sind Morgensterne zu sehen, die sich in der Folgezeit zu Rosetten erweitern.

1:400. Vereinzelte agglomerierte Paare sind zu beobachten.

1:500. Keine Agglomeration.

b) Trypanoplasmenstamm 2.

1:1. Die Bewegung der Trypanoplasmen ist gleich im Anfang sehr träge, so daß es nur zur Bildung kleiner Rosetten kommt. Nach 15 Min. sind alle Flagellaten abgerundet.

1:1 (30 Min. 64°—67°). Agglomeration mit großen Rosetten. Nach 30 Min. besteht an der Peripherie der Rosetten noch rege Bewegung.

1:20. Baldige Agglomeration. Nach 30 Min. hört die Bewegung auf.

1:20 (30 Min. 64°—67°). Man findet nach 30 Min. nur vereinzelte agglomerierte Paare. Eine Bewegungslähmung ist auch nach 2 Stunden nicht zu konstatieren.

1:100. In den ersten 10 Min. ist eine Agglomeration nicht zu beobachten. Nachher sieht man vereinzelte agglomerierte Paare. Nach 40 Minuten haben sich diese wieder getrennt, so daß im ganzen Präparat alle Trypanoplasmen frei beweglich sind.

1:200. Keine Agglomeration.

5. Hammelserum.

In den beiden folgenden Protokollen wird der Agglomerationsablauf bei Zimmertemperatur und bei einer Temperatur von 37° verglichen. Zu beiden Versuchen wurde das gleiche Serum und derselbe Trypanoplasmenstamm verwendet.

a) Bei Zimmertemperatur.

1:1. Es tritt stärkere Beweglichkeit auf und zugleich Agglomeration, die zur Bildung großer Rosetten führt. Die Schädigung ist in den ersten 30 Minuten eine geringe. Nach 40—50 Min. hört die Bewegung auf, doch behalten die Flagellaten ihre typische schlanke Form.

1:1 (30 Min. 64°—67°). Die Agglomeration geht langsamer vor sich, erreicht aber nach einiger Zeit dieselbe Intensität wie im nicht erwärmten Serum. Die Bewegung hält mehrere Stunden an.

1:20. Allmähliches Auftreten von kleinen Rosetten, die sich nicht vereinigen. Die Bewegung sistiert nach 12 Stunden.

1:20 (30 Min. 64°—67°). Keine Agglomeration.

1:50. Nach 15 Min. keine Spur von Agglomeration. Nach 13 Stunden sind alle noch frei beweglich und besitzen die typische schlanke Form.

1:100. Keine Agglomeration.

b) Bei konstanter Temperatur von 37° im Thermostaten.

1:1. Sofortiges Auftreten von Agglomerationsrosetten. Die Bewegung hört nach 10 Min. auf.

1:1 (30 Min. 64°—67°). Intensive Agglomeration mit großen Rosetten. Bewegungslähmung tritt erst allmählich auf.

1:20. Die Agglomerationsrosetten, die sich sehr bald bilden, haben einen großen Umfang.

1:20 (30 Min. 64°—67°). Keine Agglomeration.

1:50. Bereits nach 10 Min. bilden sich kleine Rosetten, die sich nicht vereinigen.

1:100. Nach 15 Min. sind Anfänge der Agglomeration zu sehen. Es bilden sich keine Rosetten.

Die Untersuchung der anderen Sera ergab, daß Ziegenserum in starker Konzentration bewegungshemmende und paralytische Kraft besitzt, während es in einer Konzentration von 1:50 noch agglomerierend wirkt. Hechtserum zeigt gleichfalls bis 1:50 Agglomerationskraft, während bei Kälberserum der Agglomerationstiter verschiedentlich sehr tief lag. Sehr oft rief Kälberserum überhaupt keine Agglomeration hervor, während andere Kälbersera wiederum gut agglomerierten. Ob dies auf das Alter der Tiere zurückzuführen ist, darauf habe ich nicht geachtet. Am schlechtesten agglomerierte Menschenserum.

Auf Grund meiner Versuche, die ich mit vielen Sera der gleichen Tierart machte, kam ich zu dem Ergebnis, daß die Agglomerations-

kraft der Sera von verschiedenen Individuen derselben Tierart mitunter nicht unwesentlich voneinander abweicht. Die Protokolle, die ich hier wiedergab, sind als Werte anzunehmen, die am meisten vorkamen.

Die Agglutinationskraft normaler Sera gegenüber Bakterien hat BÜRGI in ein Schema gebracht. Die stärkste Agglutination zeigte Rinderserum, dann folgen die Sera vom Pferd, Ziege, Hammel, Huhn, Gans, Hund, Kaninchen, Mensch, Meerschweinchen. Wenn ich in ähnlicher Weise für die Agglomeration der Trypanoplasmen in Normalsera eine Skala aufstelle, so lautet sie folgendermaßen: Rind, Pferd, Hund, Schwein, Ziege, Hecht, Hammel, Mensch. Die Gesetzmäßigkeit, die BÜRGI für Bakterien gefunden hat, würde auch für Trypanoplasmen stimmen bis auf den Unterschied im Hundeserum. Da ich jedoch nur ein Hundeserum untersucht habe, ist es leicht möglich, daß ich ein vom gewöhnlichen abweichendes Resultat erhielt.

Aus den wiedergegebenen Protokollen gehen ferner folgende Tatsachen hervor:

Das normale Serum besitzt für Trypanoplasmen zwei Wirkungen: 1. die agglomerierende, 2. die paralysierende. Die paralysierende Kraft ist besonders stark in unverdünnten Sera, und wenn sie überwiegt, so tritt Stillstand der Bewegung ein; da aber die Voraussetzung der Agglomeration die Bewegung der Flagellaten ist, so bleibt dann die agglomerierende Wirkung aus. So ist es zu erklären, daß der Höhepunkt der Agglomeration nicht bei der stärksten Konzentration des Serums liegt, sondern bei einem verdünnten Serum.

Die paralysierende Kraft wird durch 30 Minuten langes Erwärmen auf 64°—67° vollständig zerstört, was aus den Protokollen deutlich hervorgeht, so daß dann in dem auf diese Temperatur erwärmten Serum die Agglomeration in typischer Weise vor sich gehen kann. Ich konnte mich später, als ich darüber Nachversuche anstellte, davon überzeugen, daß bereits bei einer tieferen Temperatur die paralysierende Wirkung aufgehoben wird: bei allen Sera genügte ein Erwärmen auf 56°, um dies zu erreichen. Man könnte bei der paralysierenden Wirkung an eine lediglich osmotische des Serums denken, die die starke Schädigung der Trypanoplasmen herbeiführte. Die Tatsache jedoch, daß die Wirkung durch Erwärmen aufgehoben wird, zwingt uns dazu, als die Ursache der Schädigung eine paralysierende Substanz im Serum anzunehmen.

Durch das einhalbstündige Erwärmen auf 64°—67° wird aber nicht nur die paralysierende Kraft, sondern auch die agglome-

rierende beeinflußt. In den stärkeren Konzentrationen wird diese Wirkung nur abgeschwächt, während sie in Verdünnungen von 1:20, 1:100 vollkommen aufgehoben wird.

Aus dem Protokoll 4a und b erhellt, daß die einzelnen Trypanoplasmenstämme demselben Serum gegenüber eine verschieden starke Reaktion zeigen. Wenn auch darin einige Unterschiede bestehen, so besaßen doch alle Trypanoplasmen die Agglomerationsfähigkeit. Jedenfalls habe ich nie Trypanoplasmen gefunden, die in den angegebenen Normalsera nicht agglomerierten.

Wesentlich für die Agglomeration — wie ja für jeden Lebensprozeß — ist die Temperatur. Daß die Agglomeration bei höherer Temperatur schneller, bei Zimmertemperatur langsamer vor sich geht, entspricht den allgemeinen physiologischen Gesetzen. Wie aus dem Protokoll 5a und 5b ersichtlich ist, geht der Agglomerationsprozeß bei Zimmertemperatur träger vor sich. Während ferner bei einer Verdünnung von 1:100 bei Zimmertemperatur keine Agglomeration zu beobachten ist, tritt eine solche sehr wohl im Thermostaten bei 37° ein. Dies ist nicht etwa durch die erhöhte Temperatur verursacht; denn in dem Kontrollpräparat, das ohne Zusatz von Serum der gleichen Temperatur ausgesetzt wurde, trat keine Agglomeration auf.

Wir können bei der Agglomeration im allgemeinen drei Stufen unterscheiden:

1. Die Vereinigung einzelner Trypanoplasmen zu Paaren;
2. die Sternbildung, wobei sich im Zentrum noch keine degenerierten Flagellaten befinden;
3. die Rosettenbildung, wobei in der Mitte der Rosette die Flagellaten zugrunde gehen und als matter Detritus erscheinen, während an der Peripherie noch lebhafte Bewegung besteht.

Von geringer Bedeutung für den Ablauf des Phänomens ist die Beschaffenheit des Serums. Auch Serum, das bereits in Fäulnis übergegangen war und einen penetrant fauligen Geruch hatte, zeigte noch Agglomerationskraft ohne wesentliche Unterschiede in der Wirkungsweise.

Schließlich verschaffte ich mir noch Aufschluß darüber, ob eingetrocknetes Serum seine agglomerierende Kraft beibehält. Ich ließ Rinderserum auf einer Petrischale vollkommen eintrocknen, so daß man es nach einigen Tagen mit dem Spatel abkratzen konnte. Nunmehr löste ich dieses eingetrocknete Serum in physiologischer Kochsalzlösung auf und setzte einen Tropfen zu einer Aufschwemmung

von Trypanoplasmen hinzu. Der Versuch ergab, daß trotz der vollkommenen Eintrocknung die Agglomerationskraft erhalten blieb.

Neben diesen Versuchen mit normalen Sera machte ich einige mit stark verdünnten Säuren, Basen und mit Methylenblau. DÜRING hat damit bei Trypanosomen Agglomeration erzielt, und so war auch bei Trypanoplasmen ein positives Resultat zu erwarten.

Setzt man zu einer trypanoplasmenhaltigen Aufschwemmung einen Tropfen einer stark verdünnten Methylenblaulösung hinzu (Methylenblau in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst), so treten nach kurzer Zeit einige Agglomerationssterne auf. Doch ist die Wirkung keine sehr starke, sondern geht unter dem Bilde der Agglomeration eines ganz schwach wirkenden, stark verdünnten normalen Serums vor sich.

In ähnlicher Weise wirkten KOH und HCl 0,001—0,0001 Proz. Je geringer die Konzentration, desto stärker ist die Agglomeration, weil durch die stärkere Säurekonzentration die Vitalität der Trypanoplasmen geschädigt wird.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die Forderung, stets peinlich sauber zu arbeiten, da Spuren von Säuren in der Pipette oder im Glasschälchen, die die Aufschwemmung der Trypanoplasmen enthielt, schon zu einer Agglomeration führen mußten.

Im Receptaculum habe ich eine Autoagglomeration nie beobachtet. Dagegen traten mitunter, wenn ich die Versuche längere Zeit, d. h. mehrere Stunden ausdehnte in der trypanoplasmenhaltigen Aufschwemmung Agglomerate auf. Bestimmte Gründe für das Auftreten dieser Spontanagglomeration kann ich nicht angeben. Da sie aber meist bei sehr tiefer und bei erhöhter Zimmertemperatur (z. B. 20°—22°) eintrat, glaube ich, daß diese Umstände das Eintreten der Spontanagglomeration begünstigen. Natürlich kommen dafür auch Verunreinigungen durch Säure in Betracht.

Wenn man auf den Vorgang der Agglomeration näher eingehen will, um eine Erklärung für das Zustandekommen dieses Phänomens zu finden, so muß man sich teilweise auf das Gebiet der Theorie begeben, die aber durch Tatsachen wahrscheinlich gemacht wird.

Serum ruft eine Agglomeration der Trypanoplasmen hervor, die mit fallender Konzentration des Serums an Intensität abnimmt, und die bei Erwärmung des Serums auf eine bestimmte Temperatur gleichfalls abnimmt oder vollkommen verschwindet. Demnach muß ein wesentlicher Faktor der Agglomeration im Serum selbst liegen. Lebende Trypanoplasmen aber bilden den zweiten wesentlichen Faktor. So wie beim Zustandekommen der Bakterienagglutination

sind auch für die Agglomeration zwei Substanzen nötig: 1. die agglomerable, die den Trypanoplasmen zukommt und 2. die agglomerierende, die im normalen Serum enthalten ist. Durch einen physikalischen Vorgang, der vielleicht eine Kolloidreaktion ist — ähnlich wie es bei der Agglutination ist — tritt die Agglomeration beim Vorhandensein der agglomerablen und agglomerierenden Substanz ein.

Es ist schon lange bekannt, daß im normalen Serum agglutinierende Substanzen für Bakterien enthalten sind. Der Unterschied vom normalen Serum zum spezifischen d. h. Immunserum ist in dieser Hinsicht lediglich ein gradueller: während die normalen Sera nur in starken Konzentrationen wirksam sind, sind es spezifische noch bei ganz schwacher.

Im normalen Serum verschiedener Tiere ist nach meinen Untersuchungen auch eine für Trypanoplasmen agglomerierende Substanz, die mitunter stark wirksam ist. Versuche über ihre Natur ergaben zusammenfassend folgende Ergebnisse:

1. Sie ist bis 64° thermostabil und wird durch weiteres Erwärmen auf 64°—67° zerstört;

2. sie nimmt mit Verdünnung des Serums an Wirksamkeit ab;

3. sie ist gegen Eintrocknen widerstandsfähig;

4. sie wird durch Fäulnis nicht geschädigt, soweit dies meine Versuche ergeben haben.

Über die agglomerable Substanz war physiologisch nur in Erfahrung zu bringen, daß ihre Wirksamkeit die Vitalität der Trypanoplasmen zur Voraussetzung hat. Da ich experimentell nicht weiter kommen konnte, habe ich versucht, morphologisch über die nähere Herkunft der agglomerablen Substanz Aufschluß zu erhalten.

2. Morphologie der Agglomeration.

Ist es bei Bakterien bei ihrer Kleinheit und ihrer geringen Differenzierung einfach unmöglich, die morphologische Grundlage der Agglutination aufzudecken, die agglutinable Substanz vielleicht färberisch darzustellen, so fallen diese Nachteile bei den größeren Organismen, den Trypanosomen und Trypanoplasmen fort. Hier bestehen bestimmt differenzierte Organellen, und wenn es gelingt, diese zur Agglomeration in eine genaue Beziehung zu setzen, so ist für den funktionellen Vorgang die morphologische Grundlage gegeben.

Schon die Tatsache, daß nur lebende Trypanoplasmen agglomerieren, ließ den Gedanken aufkommen, daß die Parasiten bei diesem Phänomen auch aktiv beteiligt sind. Für ihre Beteiligung bestehen drei Möglichkeiten:

1. Der Periplast der Trypanoplasmen könnte die agglomerable Substanz darstellen. Es wäre denkbar, daß durch Erweichung der Hüllmembran ein Zustand geschaffen wird, der für die Kolloidreaktion mit der agglomerierenden Substanz des Serums geeignet ist. Dagegen spricht die Tatsache, daß die Agglomeration nicht an jeder Stelle des einheitlich gebauten Periplasten zustande kommt, sondern nur am Körperende, und daß ferner tote Trypanoplasmen nicht agglomerieren, obgleich der Periplast dann wohl kaum in seiner Struktur verändert ist. 2. Da die Agglomeration an die Beweglichkeit der Trypanoplasmen gebunden ist, wäre es möglich, daß die Geißeln, wenigstens die Schleppgeißel, dabei eine wichtige Rolle spielen. Eine Veränderung der Geißel etwa im Sinne einer Aufquellung ist nicht zu sehen. Außerdem kommt die Zusammenballung überhaupt nicht mit der Geißel, sondern mit dem hinteren Körperende zustande, was man im Leben und am gefärbten Präparat deutlich erkennen kann. Diese zweite Möglichkeit ist daher sehr unwahrscheinlich. Man hat auch bei Bakterien geglaubt, daß die Agglutination durch die Geißel zustande kommt. Als man jedoch feststellen konnte, daß auch geißellose Bakterien agglutinieren, mußte man diese Vermutung als falsch ansehen. 3. Es lag nahe, daran zu denken, daß die Trypanoplasmen eine Substanz sezernieren, die die agglomerable Substanz darstellt und sich mit der agglomerierenden vereinigt. Die Sekretion könnte durch die Sera bzw. durch Säuren hervorgerufen werden. Hatte man erst nachgewiesen, daß die Sekretion einer Substanz etwa im Leben sichtbar ist, so mußte man die weitere Frage aufrollen, welches Organell an dieser Sekretion beteiligt ist.

v. PROWAZEK hatte diese Frage in den Bereich seiner Untersuchungen gezogen und fand, daß die Trypanosomen „minutiöse Körperchen" sezernieren, daß ferner bei länger andauernder Giemsafärbung ein Schleimhauch zwischen den agglomerierten Blutflagellaten zu erkennen ist. Da diese Trypanosomen einen zerfallenen Blepharoplasten haben, und da sie ferner stets mit dem blepharoplastführenden Ende agglomerieren, also „Jugendformen, bei denen der Blepharoplast am Vorderende liegt, mit dieser Zellpartie" (27. p. 117), so ist der Autor der Ansicht, daß der Blepharoplast eine klebrige Substanz sezerniert.

MANTEUFEL lehnt diese Erklärung ab; schreibt die Zerteilung des Blepharoplasten, die auch er beobachtet hat, der trypanoziden Funktion des Serums zu und schließt: „alles in allem ist mir eine konstante und deutliche Veränderung der agglomerierten Trypano-

somen, die man als Ursache für das Zusammenhaften der Agglomerate ansprechen könnte, in Giemsapräparaten nicht aufgefallen" (p. 174).

Rössle hat mit spezifischen Sera an Infusorien Agglomerationsversuche gemacht, um die morphologischen Veränderungen an diesen bei weitem größeren Objekten zu studieren. Eine ausgesprochene Agglomeration konnte er nicht erzielen. Die behandelten Paramäcien wurden durch das spezifische Serum in ihrer Bewegung gelähmt, blieben aber nie aneinander hängen, „sondern hafteten immer nur am Glase, an Bakterienhaufen oder an Exemplaren jener kleinen Flaggellatenart, die bei der Immunisation mit verwendet ebenfalls gelähmt wurde" (p. 11). In bezug auf die Morphologie des Vorganges konnte Rössle zu keinem Ergebnis kommen.

Wenn man den Agglomerationsvorgang bei Trypanoplasmen genau verfolgt, so sieht man, ebenso wie es Prowazek an Trypanosomen beobachtet hat, am Körperende kleine, tropfenförmige, lichtbrechende Körperchen austreten. Unzweifelhaft stehen diese zur Agglomeration in irgendeiner direkten Beziehung, da sie gewöhnlich gleich im Beginn des Prozesses auftreten. Ein „Schleimhauch" ist im Leben nur schwer erkennbar. Man sieht wohl einen matten Detritus in der Mitte der Rosetten; ob dieser aber mit dem „Schleimhauch" identisch ist, und ob ihm eine wesentliche Bedeutung bei der Agglomeration zukommt, möchte ich nicht entscheiden. Meine Versuche intra vitam durch Schleimfarbstoffe wie Gentianviolett und Neutralrot zu einem sicheren Ergebnis zu kommen, waren erfolglos. Im gefärbten fixierten Präparat wiederum ist die Erhaltung der Rosetten beim Ausstrich äußerst schwierig; so daß ich über den von Prowazek beschriebenen „Schleimhauch" keine genauen Angaben machen kann. Wichtig für die weitere Untersuchung war vorerst die Beobachtung des Austritts der tropfenförmigen Körperchen.

Darüber, welches Organell diese Körperchen sezerniert, mußte das Färbepräparat Aufschluß geben. Die Anfertigung von brauchbaren, gefärbten Agglomerationspräparaten ist mit großen Schwierigkeiten verbunden. Werden nämlich die mit dem Serum behandelten Trypanoplasmen fixiert, so wird das Eiweiß gefällt und alles wird von dem gefällten Eiweiß überdeckt. Daher war es am günstigsten, Präparate anzufertigen, wenn Spontanagglomeration eintrat.

Färbt man Agglomerationspräparate mit Heidenhain's Eisenhämatoxylin [1]), so findet man mit Regelmäßigkeit als Fortsetzung

[1]) Safraninfärbung nach Fixierung mit dem Flemming'schen Gemisch und S-Fuchsin-Methylgrünfärbung gibt gleichfalls brauchbare Präparate.

des Blepharoplasten eine deutliche, sich schwarz färbende Linie, die bis an das Körperende verläuft (Fig. 3 und 7), aber manchmal im hintersten Drittel nicht mehr deutlich zu erkennen ist; doch sind dann meist einzelne Körnchen in ihrer Verlängerung sichtbar (Fig. 5). Diese Linie ist nicht immer eine glatt verlaufende, sondern hat öfters Rosenkranzform (Fig. 8), und ist mitunter nicht einheitlich, sondern mehrfach unterbrochen (Fig. 4 und 5). Sie verläuft gewöhnlich an der Blepharoplastseite bis zum Körperende. Wenn aber der Parasit bei der Spiraldrehung fixiert wird, die er bei der Vorwärtsbewegung macht, so verläuft die färbbare Linie in einer Spiraltour um den Körper (Fig. 7). Im allgemeinen ist der Farbton dieser Linie derselbe wie der des Blepharoplasten; doch ist es nicht selten, daß die Ausziehung des Blepharoplasten einen helleren Ton annimmt, oder aber daß ein heller Grund sichtbar wird, auf dem dunkler färbbare Granula aufgelagert sind (Fig. 7 und 8). In solchen Fällen zeigt auch der Blepharoplast diese Unterschiede. Bereits GELEI hat darauf aufmerksam gemacht, daß sich im Blepharoplasten von *Trypanoplasma dendrocoeli* zwei verschieden färbbare Substanzen befinden und BĚLAŘ hat bei starker Differenzierung die gleichen Verhältnisse an *Trypanoplasma helicis* gefunden. Fig. 8 zeigt diesen Unterschied in der Färbbarkeit der beiden Substanzen sowohl am Blepharoplasten wie an der Blepharoplastlinie.

In den zahlreichen Präparaten, die ich gemacht habe, konnte ich immer wieder feststellen, daß diese Linie in direkter Verbindung mit dem Blepharoplasten stand. Die Verbindung ist eine so enge und der Übergang so allmählich, daß es schwer fällt zu entscheiden, wie weit ursprünglich der Blepharoplast verlief. Dies wird einfach unmöglich, wenn die Linie und der Blepharoplast die gleiche Breitenausdehnung besitzen (Fig. 9 und 10). Der Blepharoplast ist in diesen Fällen meist verhältnismäßig schmal und macht den Eindruck, als wenn er verdoppelt wäre (Fig. 9). Dabei sind diese Bilder durchaus nicht selten.

Man könnte den Einwand erheben, daß die Blepharoplastlinie eine pathologische Erscheinung wäre, die durch das Serum hervorgerufen wird. Dies erscheint mir wenig glaubhaft, da an den anderen wohl mehr empfindlichen Zellbestandteilen wie z. B. am Kern pathologische Veränderungen nicht auftreten. Eine Verwechslung mit einem anderen ähnlichen Gebilde ist auch ausgeschlossen. Höchstens ist eine solche mit der Crista möglich, die jedoch an der Basis der undulierenden Membran verläuft, also an

der dem Blepharoplast gegenüberliegenden Seite, und die zum Blepharoplasten in keinerlei Beziehung steht.

Das regelmäßige Auftreten bei der Agglomeration, das mitunter rosenkranzförmige Aussehen dieser färbbaren Blepharoplastlinie sowie vor allem ihr Verlauf bis zum Körperende, wo die Agglomeration zustande kommt, zwingt mich zu der Annahme, daß der Blepharoplast an der Sekretion der agglomerablen Substanz beteiligt ist, und daß die färbbare Linie, die Verlängerung des Blepharoplasten, den Sekretionsstrom darstellt.

In diesem Zusammenhange war es auch von Wichtigkeit festzustellen, ob der Blepharoplast durch länger bestehende Agglomeration etwa ganz aufgelöst wird. Dies ist nicht der Fall. Selbst wenn die Agglomeration schon mehrere Stunden bestanden hat, ist eine Auflösung nicht zu beobachten. Ich glaubte aber mehrfach feststellen zu können, daß dann der Blepharoplast aufgelockert war und die beiden Substanzen, die heller und die dunkler färbbare deutlicher hervortraten. Wenn die Trypanoplasmen sich durch den allmählich einsetzenden Degenerationsprozeß abkugeln, nimmt der Blepharoplast Tropfenform an, wobei zugleich am Kern Auflösungserscheinungen auftreten.

Mit dem Ergebnis, daß der Blepharoplast an der Sekretion der agglomerablen Substanz teil hat, ist bereits Licht in den ganzen Vorgang der Agglomeration gebracht. Freilich wäre noch zu erörtern, was eigentlich diese Substanz chemisch ist. Bei Bakterien werden als Träger der agglutinablen Substanz Bakterienproteine angesehen, „die den Nucleoproteiden zuzurechnen sind". Über den chemischen Aufbau des Blepharoplasten herrscht noch großes Dunkel. Man ist sich ja nicht einmal über seinen Ursprung und seine Funktion im klaren. Wenn man die Ansicht der Schaudinn-Hartmann'schen Schule als zu Recht bestehend annimmt, wonach der Blepharoplast ein zweiter Kern ist und durch Teilung aus dem Trophonucleus entsteht (cf. *Hämoproteus*), dann könnte man auch in unserem Falle bei *Trypanoplasma* sagen, daß vielleicht Nucleoproteide des Blepharoplasten die Träger der agglomerablen Substanz sind. Da aber die Schaudinn-Hartmann'sche Lehre nicht einwandfrei erwiesen ist und stark angefochten wird, läßt sich ein bestimmtes Urteil nicht fällen. Man muß sich vorläufig mit der Feststellung begnügen, daß beim Zustandekommen der Agglomeration der Trypanoplasmen eine hervorragende Rolle der Blepharoplast spielt.

Eine färbbare Linie, die vom Blepharoplasten ausgeht, wurde auch im normalen Leben beschrieben: „Wahrscheinlich geht eine

starke Fibrille vom Blepharoplasten aus und durchzieht den ganzen Körper bis zu seinem hinteren Ende" (FRIEDRICH, p. 14). JOLLOS beschreibt mehrere Fibrillen und als häufiger vorkommend zwei starke, die knopfartig endigen. Nach seiner Figur zu urteilen, sind sie jedoch sehr dünn. KÜHN hält eine Fibrille für wahrscheinlich. BĚLAŘ und KEYSSELITZ glauben, daß die Fibrillen von den Basalkörnern ausgehen. Daß diese färbbare Linie den Namen „Fibrille" erhielt, liegt daran, daß die Beobachter ihr Stützfunktion zuschrieben.

Ich glaube, daß diese im normalen Leben nicht zu oft sichtbare „Fibrille" mit der von mir bei der Agglomeration mit Regelmäßigkeit gefundenen Blepharoplastlinie identisch ist, wenn auch die von mir beschriebene durch ihre Form und ihre Dicke ziemlich abweicht. Es wäre dann freilich eine Erklärung dafür nötig, warum diese Blepharoplastlinie auch im normalen Leben vorkommt. Die Erklärung dafür ist nicht schwer, wenn man bedenkt, daß bei Trypanoplasmen die Thigmotaxis eine weit verbreitete Erscheinung ist, und daß diese in Analogie zu anderen Protozoen auch bei Trypanoplasmen mit der Sekretion einer Substanz zusammenhängen dürfte, die vielleicht klebrige Eigenschaften hat.

Agglomeration können wir nach all dem Vorhergesagten definieren als die Erscheinung der Attraktion lebender Trypanoplasmen zueinander, die hervorgerufen wird durch gewisse Sera, und die mit der Ausscheidung einer agglomerablen Substanz durch den Blepharoplasten zusammenhängt, wobei aber die Trypanoplasmen nicht geschädigt werden. Die Agglomeration kommt wahrscheinlich durch einen physikalischen Vorgang zwischen der im Serum enthaltenen (agglomerierenden) und der von den Trypanoplasmen ausgeschiedenen (agglomerablen) Substanz zustande.

Verhalten der Trypanoplasmen in vitro und Züchtungsversuche.

Ein besonderes Interesse hat die Kultur aller Protozoen und so auch unseres Flagellaten. Züchten heißt ja die normalen Lebensbedingungen nachahmen und die Züchtung bringt uns mitunter erst auf gewisse biologische Eigenschaften der Organismen, die der einfachen Beobachtung entgehen. Es ist leider eine unbestreitbare Tatsache, daß man seit dem Aufschwung der Protozoenkunde die Biologie im engeren Sinne von den parasitischen Einzelligen mehr oder weniger außer acht ließ und nur auf die Morphologie besonderen Wert legte. Und dabei bieten uns doch die einfachen strukturellen Verhältnisse eine im allgemeinen leichte

Handhabe zur Erforschung aller Lebenserscheinungen. — Aber noch ein anderer Grund — natürlich neben dem, stets reichliches und leicht zugängliches Material zur Verfügung zu haben — veranlaßte die Protozoenforscher gerade auf die Kultur von Parasiten und da besonders von Blutparasiten großen Wert zu legen. Man erhoffte bei der Züchtung die ununterbrochene Kette des Entwicklungsganges dieser Formen aufzufinden, wenn ein solcher besteht. Alle diese Gründe waren auch für mich maßgebend.

Versuche, Trypanoplasmen zu züchten, wurden erst von wenigen unternommen, jedoch mit negativem Erfolg. Friedrich erwähnt, daß es ihm gelang, *Trypanoplasma helicis* in physiologischer Kochsalzlösung eine Woche und länger am Leben zu erhalten, wenn die Aufschwemmung stets gut durchlüftet wurde.

Welcher Wert dieser Bemerkung zuzumessen ist, wird aus meinen Versuchen hervorgehen. Kühn, der gleichfalls die in Schnecken parasitierende Art zu seinen Versuchen verwandte, berichtet, daß er mit verschiedenen Nährböden, mit Bouillonagar vermischt mit Schneckenblut, sowie mit Schneckenblutagar keinen Erfolg hatte. „Nach zwei Tagen fand ich niemals mehr lebende Flagellaten“ (p. 84). Als Grund für das Mißlingen der Züchtung gibt er das Überwuchern durch Bakterien an.

Von anderen Trypanoplasmenarten versuchte Keysselitz *Trypanoplasma borreli* des Fischblutes auf Blutagar zu züchten, ohne daß es ihm gelang. Walker dagegen züchtete mit Leichtigkeit *Trypanoplasma ranae,* das dieser Autor einmal im Darm von *Rana palustris* beobachtet hat, auf gewöhnlichem Amöbenagar. Diese Art unterscheidet sich aber von allen anderen nach Walker durch die Nahrungsaufnahme: sie hat ein Cytostom und lebt von Bakterien. In seiner Arbeit kommt dieser Autor zu dem interessanten Ergebnis, daß die in der Kultur auftretenden abweichenden Formen nicht Entwicklungsstadien, sondern eine Folge der vorhandenen Nahrungsmenge sind. Ferner beschreibt er eine Form, die er als Vorbereitung zur Encystierung ansieht, ohne Cysten selbst gesehen zu haben.

Zunächst stellte ich fest, wie lange überhaupt die Trypanoplasmen in physiologischer Kochsalzlösung zu leben imstande sind. Ich benutzte als Kulturgläschen etwa 4—5 cm hohe Eprouvetten mit einer Lichtung von 5—6 mm, die nach dem Ende zu konisch verjüngt waren. Die Kochsalzlösung wurde stets ausgekocht, um nicht unnötig Bakterien in die Kultur hineinzutragen. Trotz alledem habe ich in diesen Gläschen die Trypanoplasmen nie länger als 4 Tage erhalten können, auch wenn ich die Aufschwemmung

gut durchlüftet habe. Schädigungen zeigen sich jedoch schon bei einzelnen am ersten Tage ganz deutlich, indem die Flagellaten ihre freie Ortsbewegung aufgeben. Verschiedene Gründe kommen für das frühzeitige Auftreten der Absterbeerscheinungen in Betracht: Bakterien könnten schädigend einwirken. Dies ist jedoch nicht der Fall, da ich nach Möglichkeit steril arbeitete und die Bakterienentwicklung am 2. und 3. Tage noch nicht so hochgradig war. Im Receptaculum selbst sind nämlich Bakterien, so daß man vollkommen steril überhaupt nicht kultivieren kann. Außerdem sind die Trypanoplasmen gegen Bakterien und ihre Produkte gar nicht so empfindlich wie aus meinen weiteren Versuchen hervorgehen wird. Ferner könnten die eigenen Stoffwechselendprodukte der Flagellaten, gegen deren Anhäufung ja alle Lebewesen mehr oder weniger empfindlich sind, einen schädigenden Einfluß ausüben. Dieses Moment scheint mir weniger ausschlaggebend zu sein, weil die Schädigung verhältnismäßig frühzeitig eintrat, und ferner weil die Noxe ganz unabhängig von der Zahl der Trypanoplasmen und der Wassermenge auftrat. Um aber diese Möglichkeit ganz auszuschalten, wechselte ich das Wasser alle 6 Stunden. Trotzdem waren nach 4 Tagen alle Flagellaten bewegungslos und abgestorben. Als nächstes schädigendes Moment kam das Medium selbst in Betracht, also die physiologische Kochsalzlösung. PÜTTER hat ja nachgewiesen, daß diese für Opalinen durchaus nicht indifferent ist und verwandte daher eine Lösung, die Seignettesalz[1]) enthielt. Ich machte auch damit einige Versuche, jedoch mit dem gleichen negativen Erfolg. Da die Schädigung erst mit der Zeit eintrat, so war vor allem an eine Hungerwirkung zu denken, und dafür sprach auch folgende Tatsache, daß die Flagellaten nicht zu gleicher Zeit starben. Während bei einzelnen schon nach 5—6 Stunden Absterbeerscheinungen zu beobachten waren, waren andere mitunter noch nach 2 Tagen frei beweglich. Sicher sind es die verschiedenen physiologischen Zustände, die die verschieden lange Lebensdauer unter den gleichen Lebensbedingungen verursachen. Die verschiedenen physiologischen Zustände aber sind wahrscheinlich der verschiedene Gehalt an Reservestoffen.

Es galt nunmehr eine geeignete Nahrung für die Trypanoplasmen zu finden. Es lag nahe, Eiweiß zu verwenden, da die

[1]) Die Zusammensetzung der PÜTTER'schen Flüssigkeit ist folgende:

NaCl-Lösung 0,8 Proz.	100 ccm
Seignettesalz 30 Proz.	5 ccm
Aqu. dest.	400 ccm.

Trypanoplasmen unter normalen Lebensbedingungen auch von Eiweiß leben. Ich impfte das sterile Weißei vom Hühnerei mit Trypanoplasmen, jedoch mit dem Erfolg, daß alle Flagellaten in wenigen Stunden zugrunde gingen. Nach mehreren mißlungenen Versuchen habe ich als günstige Konzentration gefunden: 2 Tropfen Eiweiß auf 1 ccm physiologische Kochsalzlösung. Alle 5 Tage wurde die Flüssigkeit erneuert. In dieser Lösung hielten sich die Trypanoplasmen 20—25 Tage; mehrfach konnte ich Teilungen beobachten. Die Flagellaten behielten ihre schlanke Form und bewegten sich lebhaft. Schon wenige Tage nach Ansetzen der Kulturen entwickeln sich in diesem günstigen Medium Bakterien in großer Menge, die aber vorerst die Trypanoplasmen nicht schädigten. Veränderungen in der Form der Parasiten habe ich nicht beobachtet. Am 20. Tage wurden gewöhnlich die ersten der von mir vorher beschriebenen Degenerationsstadien sichtbar. Von da ab trat ein unaufhaltsames Absterben der Trypanoplasmen ein.

Neben diesen Versuchen mit Eiweiß, machte ich noch andere mit Traubenzucker, Rohrzucker, Pepton, Schneckenbouillon, sowie mit festen Nährböden nach Novy (mit Eiweiß) und mit Amöbenagar. Mit keinem dieser Versuche hatte ich Erfolg, ohne daß ich den Grund für das Mißlingen vor allem der Versuche mit Nährböden angeben kann.

Im Zusammenhang mit der Kultivierung stand die Frage, wie sich die Trypanoplasmenaufschwemmungen der Einwirkung verschiedener Temperaturen gegenüber verhalten. Es fiel mir im Hochsommer auf, daß die Trypanoplasmen in Kochsalzlösung nur wenige Stunden ihre Lebensfähigkeit behielten. Um dies näher nachzuprüfen, stellte ich folgenden Versuch an: Vom gleichen Stamm machte ich zwei Trypanoplasmenaufschwemmungen, die ich in Glasröhrchen auffüllte, von denen das eine unter Zimmertemperatur (16°), das andere im Eisschrank (4°) gehalten wurde. Das Verhalten unter diesen verschiedenen Bedingungen war folgendes:

I. Glasröhrchen bei Zimmertemperatur:

24 Stunden: etwa 50 Proz. der Trypanoplasmen sind freibeweglich, während die anderen unter Degenerationserscheinungen ihre Bewegung eingestellt haben.

48 Stunden: fast keine Flagellaten in freier Bewegung; ein Teil besitzt noch Kontraktions- und Geißelbewegung.

72 Stunden: nur vereinzelte in pendelnder Bewegung.

96 Stunden: keine Bewegung; alle Flagellaten abgestorben.

II. Glasröhrchen bei Eisschranktemperatur:
3. Tag: alle Trypanoplasmen in freier lebhafter Bewegung.
7. Tag: desgleichen.
14. Tag: sehr viele beweglich; nur vereinzelte abgestorben.
20. Tag: vereinzelte in pendelnder oder krampfhaft zuckender Bewegung; alle anderen abgerundet und tot.
24. Tag: keine Bewegung; alle Flagellaten sind abgestorben.

Aus diesem Versuch erhellt, daß sich die Trypanoplasmen bei tieferer Temperatur viel länger ohne Nahrung erhalten können. Denn einen anderen Grund wüßte ich nicht, der für die längere Lebensdauer in Frage käme. Man könnte noch an die Schädigung durch Bakterienentwicklung denken, die bei höherer Temperatur natürlich in höherem Maße vor sich geht. Ich habe aber schon vorher darauf hingewiesen, daß einmal in den ersten Tagen überhaupt nicht so reichlich Bakterien vorhanden sind, und daß ferner die Trypanoplasmen in Eiweißkulturen trotz der Anwesenheit von Bakterien gut gedeihen. Es ist also lediglich der in der Kälte herabgesetzte Stoffwechsel, der ein längeres Leben ermöglicht.

Dieser Versuch verschafft uns wiederum einen tieferen Einblick in die Biologie der Trypanoplasmen. Denn es geht daraus hervor, daß die Parasiten in der Kälte lange Zeit auch ohne Nahrung lebensfähig bleiben. Im Winter, wo der ganze Lebensprozeß des Wirtes, der Schnecke, auf ein Mindestmaß herabgesetzt ist, wo auch der Säftestrom im Receptaculum versiegt, sind die Trypanoplasmen auf ein Nahrungsminimum angewiesen. Hier kommt ihnen die Temperatur zu Hilfe, die ihre Lebenserscheinungen und ihren Stoffwechsel gleichfalls auf ein Minimum reduziert.

Auf eine interessante Erscheinung der in Eiweiß kultivierten Trypanoplasmen möchte ich noch kurz eingehen. Impft man die Eprouvetten mit Flagellaten, die keine oder nur wenige Zelleinschlüsse enthalten, so treten nach wenigen Tagen im Körper dieser Kulturtrypanoplasmen stark lichtbrechende Granula auf, die mitunter eine beträchtliche Größe besitzen. Da diese Einschlüsse mit Regelmäßigkeit in den Flagellaten der Eiweißkulturen zu finden waren, war sofort dabei an Reservestoffe zu denken, und da sie eine starke Lichtbrechung zeigten, machte ich zunächst Fettproben mit Scharlachrot und Osmiumsäure, die negativ ausfielen. Auch die Volutinprobe nach A. MEYER war negativ. Dagegen ergab die BEST'sche Glykogenprobe [1]) ein positives Resultat. Man kann in dem

[1]) Nach den Angaben von G. HERXHEIMER (Technik der pathologisch-histologischen Untersuchungen, Wiesbaden 1912) machte ich die Färbung folgendermaßen:

nach Best gefärbten Präparat größere und kleinere Granula unterscheiden, die einen tiefroten Farbton haben, während das Plasma schwach rot gefärbt ist (Fig. 13 und 14). Meist liegen die Einschlüsse hinter dem Kern, doch kann man kleinere Körner auch vor dem Kern beobachten. Eine bestimmte Anordnung etwa in einer geraden Linie ist nicht vorhanden, sondern regellos liegen die Reservestoffe im Plasma. Im Polarisationsmikroskop verhalten sie sich wie isotrope Körper, sind also einfachbrechend. Durch Ptyalin, dem diastatischen Ferment des Speichels, werden die Körperchen aufgelöst. Dies kann man ganz deutlich in einem nach Best gefärbten Präparat erkennen. Läßt man 24 Stunden bei 37° im Thermostaten Speichel auf die gefärbten Trypanoplasmen mit den Granula einwirken, so lösen sich die Körner auf, und der ganze Flagellatenkörper nimmt einen etwas tiefer roten Farbton an. Nach Zusatz von Jodtinktur oder Jodjodkali erscheinen die Granula gelbbraun.

Man kann diese Einschlüsse auch mit Heidenhain's Eisenhämatoxylin darstellen, wenn man zunächst in starker Flemming'scher Flüssigkeit und dann — nach kurzem Abspülen mit Wasser — in konzentrierter Sublimatlösung fixiert (Fig. 11 und 12). In solchen Präparaten kann man heller und dunkler färbbare Granula unterscheiden, die bald im vorderen, bald im hinteren Körperteil liegen. Sicher wohl ist die unterschiedliche Färbung eine Folge der verschiedenen Dichtigkeit der Einschlüsse. Die größeren Granula lassen ringsherum einen helleren Hof erkennen und können, wie aus Fig. 12 hervorgeht, beträchtliche Dimensionen erreichen. Der hellere Hof entsteht vielleicht durch Schrumpfung der Granula.

Einschlüsse wurden bei Trypanoplasmen bereits von früheren Beobachtern beschrieben und zwar teils als Chromatinpartikel

---

a) Härten in absolutem Alkohol,

b) 24 Stunden färben in nachstehender Karminlösung:

Best'sches Karmin	20 Teile
Ammoniak	30 „
Methylalkohol	30 „

Best'sches Karmin wird folgendermaßen hergestellt: Karmin 2,0 g, Kaliumkarbonat 1,0 g, Chlorkalium 5,0 g, Aqua dest. 60 ccm. Die Lösung wird gekocht und dann 20 ccm Ammoniak hinzugetan.

c) Differenzieren unter dem Mikroskop in folgender Mischung:

Alkohol. absol.	40 Teile
Methyalkohol	20 „
Aqua dest.	50 „

d) Überführen in 80proz. Alkohol, Alkohol absol., Xylol. Kanadabalsam.

teils als Volutinkörner. Neben diesen Granula werden von GELEI und BĚLAŘ große „Kugeln" beobachtet, die die Alveolen ausfüllen, deren Bedeutung aber unklar ist. Allem Anschein nach sind diese „Kugeln" mit den Einschlüssen zu identifizieren, die ich in Kulturtrypanoplasmen beobachtet habe. Die BEST'sche Färbung ist mit bestimmtem Resultat von keinem der früheren Beobachter gemacht worden.

Im normalen Leben kommen die großen Einschlüsse weniger zahlreich vor, aber auch da konnte ich sie mit der BEST'schen Methode nachweisen. Da die zwei Methoden, die für Glykogen spezifisch sind, die Ptyalinreaktion und die BEST'sche Färbung positiv ausfielen, so liegt es nahe, anzunehmen, daß diese Granula aus Glykogen bestehen. Wenn die Jodreaktion nicht vollkommen eindeutig ausfiel, so mag dies daran liegen, daß durch den Periplasten hindurch das Jod zu wenig wirksam ist. Ein Herauspressen der Körner durch Zerdrücken der Trypanoplasmen ist mir aber bisher nicht gelungen. Andererseits besteht aber die Möglichkeit, daß diese Reservestoffe nicht aus reinem Glykogen bestehen.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Professor Dr. DOFLEIN, für die Anregung zu dieser Arbeit und für das Interesse, das er meinen Untersuchungen stets entgegenbrachte, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Breslau, im Dezember 1921.

Literaturverzeichnis.

1) ADERHOLD, R.: Beitrag zur Kenntnis richtender Kräfte bei der Bewegung niederer Organismen. Jen. Zeitschr. f. Naturwiss. Bd. 22 1888 p. 310.
2) BĚLAŘ, C.: Beiträge zur Kenntnis der Entwicklungsgeschichte von Trypanoplasma helicis LEIDY. Arch. f. Protistenk. Bd. 36 1916 p. 255.
3) BÜRGI, E.: Über Bakterienagglutination durch normale Sera. Arch. f. Hyg. Bd. 62 1907 p. 239.
4) BÜTSCHLI, O.: Mastigophora. in: BRONN's Klassen u. Ordnungen des Tierreichs I 2 1883—87.
5) DOFLEIN, F.: Lehrbuch der Protozoenkunde. 4. Aufl. Jena 1916.
6) DÜRING, A.: Studien über Agglomeration und Immunität bei Trypanosoma Lewisi. Inaug.-Diss. Bern 1908.
7) FRANCIS, E.: An experimental Investigation of Trypanosoma Lewisi. Hygienic laboratory bulletin 11. Public health and Marine-Hospital service of the United States. Washington 1903.

8) Friedrich, L.: Über Bau und Naturgeschichte von Trypanoplasma helicis Leidy. Arch. f. Protistenk. Bd. 14 1909 p. 363.
9) Gelei, I.: Bau, Teilung und Infektionsverhältnisse von Trypanoplasma dendrocoeli Fantham. Arch. f. Protistenk. Bd. 32 1914 p. 171.
10) Hagemeister, W.: Über die Züchtung pathogener Trypanosomen auf künstlichen Nährböden. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 77 1914 p. 227.
11) Hartmann, M. u. Jollos, V.: Die Flagellatenordnung „Binucleata". Arch. f. Protistenk. Bd. 19 1910 p. 81.
12) Hartmann, M. u. Schilling, Cl.: Die pathogenen Protozoen. Lehrbuch Berlin 1917.
13) Jennings, H. S.: Das Verhalten der niederen Organismen. Übersetzt von Mangold. Leipzig 1910.
14) Jensen, P.: Über den Geotropismus niederer Organismen. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 53 1893.
15) Jollos, V.: Bau und Vermehrung von Trypanoplasma helicis. Arch. f. Protistenk. Bd. 21 1911 p. 103.
16) Jürgens: Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen. Arch. f. Hyg. 1902 p. 265.
17) Keysselitz, G.: Generations- und Wirtswechsel von Trypanoplasma borreli Laveran et Mesnil. Arch. f. Protistenk. Bd. 7 1906 p. 1.
18) Kühn, M.: Die Trypanoplasmen und deren Verbreitung in einheimischen und ausländischen Schnecken. Schriften d. physik.-ökonom. Gesellsch. Königsberg i. Pr., 52. Jahrg. 1911 p. 63.
19) Künkel, K.: Zur Biologie der Lungenschnecken. Heidelberg 1916.
20) Lange: Makroskopische Agglutination bei Trypanosomen. Centralb. f. Bakt. Bd. 50 (Referate) 1911 Beiheft p. 171.
21) Laveran, A. et Mesnil, F.: De la longue conservation à la glacière des trypanosomes du rat et de l'agglomération de ces parasites. Compt. rend. de la Société de biologie 1900 p. 816.
22) — —: Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers sérum. Ibid. p. 939.
23) Manteufel: Untersuchungen über spezifische Agglomeration und Komplementbildung bei Trypanosomen und Spirochäten. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin Bd. 28 1908 p. 172.
24) Mattes, W.: Agglutinationserscheinungen bei Trypanosomen. Centralbl. f. Bakteriol. (Originale) Bd. 65 1912 p. 554.
25) Mayer, M.: Pathogene Trypanosomen. in: Prowazek's Handbuch der pathogenen Protozoen. Leipzig 1912.
26) —: Nachtrag. Ibid. 1920.
27) Meyer, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg. Bd. 62 1904 p. 113.
28) Neresheimer: Die Gattung Trypanoplasma. in: Prowazek's Handb. d. path. Protozoen Teil. 1. Leipzig 1912.
29) Paltauf, R.: Die Agglutination. in: Handb. d. path. Microorganismen Kolle-Wassermann Bd. 2 p. 1. Jena 1913.
30) Prowazek, S. v.: Studien über Säugetiertrypanosomen. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin Bd. 22 1905 p. 351.
31) —: Einführung in die Physiologie der Einzelligen (Protozoen). Leipzig und Berlin 1910.

32) Pütter, A.: Studien über Thigmotaxis bei Protisten. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1900 p. 243.
33) —: Die Atmung der Protozoen. Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. 5 1905 p. 566.
34) —: Vergleichende Physiologie. Jena 1911.
35) Rössle, R.: Spezifische Sera gegen Infusorien. Arch. f. Hyg. Bd. 54 p. 1.
36) Sachs, H. u. Ritz, H.: Experimentelle spezifische Diagnostik mittels Agglutination, Bakterizidie (Lyse) und Komplementbindung. Handb. d. path. Microorganismen Kolle-Wassermann Bd. 3 1913.
37) Schern, K.: Über die Wirkung von Serum und Leberextrakten auf Trypanosomen. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin Bd. 38 1911 p. 338.
38) Verworn. M.: Allgemeine Physiologie. 4. Aufl. 1907.
39) Volk, R.: Über Agglutination. Handb. d. Immunitätsforsch. Bd. 2 Jena 1909.
40) Walker, E. L.: The cultivation of the parasitic Flagellata and Ciliata of the intestinal tract. Journ. of medical Research Vol. 18 1908 p. 487.
41) —: Trypanoplasma ranae n. sp. and its life-cycle in cultures. Journ. of medical Research Vol. 23 1910 p. 391.
42) Woodcock, H. M.: The Haemoflagellates: a Review of present knowledge relating to the Trypanosomes and allied forms. Quart. Journ. of micr. Sci. T. 50 1906.

Tafelerklärung.

Tafel 5.

Alle Figuren wurden mit dem Abbe'schen Zeichenapparat entworfen. Optik: Zeiss apochrom. Imm. 2 mm und Comp. Oc. 18 (nur Fig. 1 u. 2 mit Comp. Oc. 12). Tubuslänge 160 mm. Soweit nichts anderes vermerkt, sind die Präparate mit Schaudinn'scher Flüssigkeit fixiert und mit Eisenhämatoxylin gefärbt.

Fig. 1 u. 2. Agglomerationsrosetten.

Fig. 3—10. Trypanoplasmen aus zersprengten Agglomerationsrosetten mit ausgezogenem Blepharoplasten.

Fig. 11 u. 12. Kleine und große Zelleinschlüsse. (Flemming-Sublimat. E.H.)

Fig. 13 u. 14. Kleine und große Zellgranula. (Alkoholfixierung. Best'sche Glykogenfärbung.)

Schindera.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Archiv für Protistenkunde

Jahr/Year: 1922

Band/Volume: 45_1922

Autor(en)/Author(s): Schindera Maximilian

Artikel/Article: Beiträge zur Biologie, Agglomeration und Züchtung von Trypanoplasma helicis Leidy. 200-240