

(Aus dem Histologischen Institut der Universität in Wilno, Polen.)

Mikrochemische Untersuchungen des veraschten
Paramecium caudatum.
Verteilung von Kalk und Eisen in der Zelle.

Von

Jan Kruszyński.

Mit Tafel 1.

Obwohl das die Struktur und das Leben der Protozoen, besonders das *Paramecium caudatum*, betreffende Schrifttum sehr umfangreich ist, so gibt es dennoch nur wenige Abhandlungen (J. GROBICKA und J. WASILEWSKA, 1925, KALMUS, 1931), die ausschließlich chemischen Untersuchungen an diesen Tieren gewidmet waren. Besonders spärlich sind solche Arbeiten, in deren Verlaufe die Verf. den Versuch machten, die Mineralstruktur der Protozoen mit Hilfe der Methode der Mikroveraschung kennenzulernen und festzustellen, aus welchen Bestandteilen sie aufgebaut wären. Die Gründe, um deren willen diese Probleme beiseite geschoben worden waren, sind zahlreich: einer der wichtigsten betraf ohne Zweifel die technische Seite der Untersuchungen. Die bei der Mikroveraschung angewandten Fixierungsflüssigkeiten rufen nämlich eine allzu rasche Koagulation des Gewebseiweißes hervor und bewirken starke Deformation und Veränderungen in der Zellstruktur, weshalb sie auch zu cytologischen Untersuchungen wenig geeignet sind. Weiterhin schrumpft das Gewebe während des Verkohlens und der Veraschung zusammen und erliegt Deformationen (GODLEWSKI, 1937), so daß man in der aus

dem Gewebsschnitte zurückgebliebenen Asche in manchen Fällen vergebens nach einer Zellstruktur sucht. Aus einer ganzen Reihe von cytochemischen Untersuchungen sind nur einige wenige zufriedenstellend.

Es gibt nur einige der Mineralstruktur der Protozoen gewidmete, mit Hilfe der Mikroveraschung festgestellte, wissenschaftliche Arbeiten. Als erster arbeitete auf diesem Gebiete POLICARD, der als eigentlicher Schöpfer der bestehenden Untersuchungsmethoden anzusehen ist. Im Jahre 1929 veröffentlichte er seine Beobachtungen über anorganische Ablagerungen nach Veraschung von Glockentierchen (*Carchesium polypinum*). Bei dieser Gelegenheit stellte POLICARD fest, daß die Glockentierchen Mineralreste zurückließen, welche dem Gewebsectoplasma sowie auch teilweise dem Entoplasma entsprächen. Ein Teil der Reste gehörte den Vakuolen an. Die Asche wies in ihren äußeren Abschnitten Spuren von Eisen auf. G. H. SCOTT und E. S. HORNING (1932—33) veröffentlichten die Resultate ihrer Untersuchungen an *Opalina* und *Nyctotherus cordiformis*. Die Reste entsprechen den Vakuolen, den Basalkörperchen der Cilien und den neuromotorischen Fäserchen. Auf Grund der gelblichen Färbung eines Teiles der Reste kamen die Verf. ebenso zu der Ansicht, daß in den Protozoen Eisen enthalten sei. Vielmehr Einzelheiten betreffs der Mineralstruktur gewisser Protozoen brachten zwei Arbeiten von McLENNAN und MURER (1934 a b), in welchen die Autoren bei *Paramecium* nach seiner Veraschung über Mineralreste berichten, die vom Kern, den Vakuolen, Trichocysten, Cilien, Basalkörperchen, Mitochondrien und dem Vacuom zurückgeblieben wären. Die Identifizierung im Spodogramm solcher Zellorganoide wie das Chondriom oder aber insbesondere wie das Vacuom läßt jedoch die veröffentlichten Resultate mit gewisser Vorsicht annehmen — obschon die Arbeit im allgemeinen sehr gut ist. In einer zweiten Arbeit über *Trichonympha* aus dem Jahre 1934 berichteten dieselben Autoren über die von dem neuromotorischen System, dem Chromatin, der Kernmembran und dem Hyaloplasma zurückgebliebene Asche.

Letztens hat LANSING (1938) seine Untersuchungen über den Calciumgehalt bei *Paramecium caudatum* veröffentlicht; der Verf. entdeckte mit Hilfe von Färbemethoden, daß sie vor allem in den peripheren Abschnitten des Protozoen enthalten sind. In allen oben erwähnten Arbeiten, mit Ausnahme der Mitteilung von LANSING, veröffentlichten die Verf. ausschließlich Beschreibungen über mineralige Ablagerungen ohne chemische Analyse derselben.

Material und Methode.

Der Zweck meiner Arbeit war, die Mineralstruktur von *Paramecium* an Hand einer von mir verbesserten Methode (Z. Zellf. 28, 1938) zu untersuchen und die mineralige Zusammensetzung der Konkremente mittels mikrochemischer Reaktionen kennenzulernen. Als Material diente mir auf einfachem Heuinfus gezüchtetes *Paramecium caudatum*. Um die Methodik der Mikroveraschung mehr den cytologischen Untersuchungsmethoden anzueignen, gebrauchte ich neben 95 Proz. Alkohol-Formolmischung und absolutem Alkohol auch andere Fixierungsflüssigkeiten. Proben mit Fixierung mittels Sublimat schlugen fehl. Mit Wasser resp. Alkohol verdünntes chemisch reines Sublimat verflüchtigt sich zwar bei höherer Temperatur, geht aber mit dem Eiweiß der tierischen Gewebe gewisse Verbindungen ein, die selbst bei einer Temperatur von 600° C noch auf dem Glase zurückblieben. GODLEWSKI führte (1937) als Fixierungsmittel in der Spodographie die BOUINSche Flüssigkeit ein, die als Fixator von mir und T. GINŦKO erprobt worden ist. Wir stellten fest, daß die Menge der Asche der in absolutem Alkohol und BOUINScher Lösung fixierten Gewebe optisch sich nicht voneinander unterschied, groß war dagegen die Differenz in dem Grade der Fixierung der Zellen. Die Zeitdauer des Fixierungsprozesses (2—24 Stunden) in BOUINScher Lösung hatte keinen größeren Einfluß auf die Auflösung der Salze.

Außerdem wandte ich zum Fixieren der Protozoen noch Formol-(leichte Polymerisation) und Osmiumdämpfe an.

Ich veraschte die Präparate teilweise ganz, teilweise bettete ich sie in Paraffin und zerschnitt sie. Die Schnitte waren verschieden dick, von 2, 3, 6, 9 zu 12 μ . An dieser Stelle möchte ich ganz besonders hervorheben, daß die Differenzen in der Stärke (Dicke) der zur Veraschung vorgesehenen Schnitte von großer Bedeutung bei der Feststellung der von verschiedenen Zellstrukturen zurückgebliebenen Mineralreste sind. Die auf den Deckgläschen befindlichen Schnitte veraschte ich in der Temperatur dunkler Glut in einer Kieselsteinröhre innerhalb von 45 bis zu 90 Minuten. Immer begann ich aber den Veraschungsprozeß in Zimmertemperatur. Ebenso wurden die Präparate allmählich abgekühlt. Die Spodogramme untersuchte ich im Ultropak von LEITZ, in durchfallendem und polarisiertem Lichte.

Die mikrochemische Reaktion führte ich mittels des Mikromanipulators von CHAMBERS unter mittlerer und starker (Immersion) Vergrößerung an. Die Kalksalze fand ich mittels H_2SO_4 ,

H_2SO_4 conc. pr. anal.	2,0
Aq. bidestill.	100,0
Alkohol 95	5,0

das Eisen mittels Ammoniumrodanat und Kalium Ferrocyanatum ¹⁾

K. Ferrocyan. pr. anal. Merck.	2,0
Ac. hydrochl. 1,124 pr. anal. Merck	1,0
Aq. bidestill.	100,0

Die Kontrollschnitte wurden mit Eisen-Hämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt.

Ergebnisse der Untersuchungen.

Die von den Protozoen zurückgebliebenen Mineralkongremente entsprechen vollständig verschiedenen mit Hilfe von Färbemethoden resp. durch Beobachtungen an lebendem Material aufgefundenen Zellorganoiden. Die Orientierung in der Mineralstruktur des veraschten *Paramecium* bietet auch keine größeren Schwierigkeiten.

Zellkern. Die stärkste Anhäufung von Kongrementen entspricht dem Zellkerne (Macronucleus) Taf. 1 Fig. 1. Die Ablagerungen bestehen aus einer größeren Anzahl von weißen und gelblichen, dicht nebeneinander gelegenen Körnchen. Die gelbliche Färbung weist nach POLICARD auf die Gegenwart von Fe hin ²⁾. Was die Mikroreaktion auf Fe in dem Zellkern von *Paramecium* anbetrifft, so führte ich dieselbe mit folgenden Methoden aus:

1. Mit Rücksicht darauf, daß das Spodogramm bei Verbleiben in der feuchten Kammer einer Zerstörung erliegt (Wasser an sich zieht), die Fixierungsflüssigkeit wiederum in einer trockenen Kammer rasch austrocknete, gab ich bei der Untersuchung der Kongremente das Reagens einige Male hinzu. Bei Begießen mit Eisencyanat zeigte sich eine blaue Färbung im Zellkerne.

¹⁾ Die Reaktionen mit K. Ferrocyan. ergaben bessere Resultate.

²⁾ Das Feststellen der Anwesenheit von Fe im Spodogramm auf Grund der gelben Färbung kann nicht als ganz sichere Methode angesehen werden. In dicken Schnitten ($10\ \mu$ und mehr) läßt sich das Fe mit Leichtigkeit darstellen, in dünneren Schnitten dagegen ($2-3\ \mu$) kommen bei Besichtigung des Präparates in starker Beleuchtung Erscheinungen der Interferenz und Refraktion des Lichtes auf den Ascheilchen zustande, was eine regenbogenförmige Färbung der Kongremente zur Folge hat. Ein solches Licht täuscht Fe-Oxydate vor.

2. Ich schürfte mit einer Mikropipette die von dem Zellkerne des Protozoen zurückgebliebenen Mineralreste ab und begoß sie mit dem Reagens entweder auf dem Deckglase selbst oder aber direkt auf dem Ende der Mikropipette. Die Reaktion fiel positiv aus.

3. Ich entfernte die Zellkernreste mehrerer Protozoen von dem Spodogramm und brachte sie zusammen auf ein Deckglas außerhalb des Protozoen, wo ich sie mit dem Reagens begoß.

Bei Anwendung von Kali-Ferrocyanat erhielt ich eine dunkelblaue Färbung, was auf eine positive Reaktion hinwies.

Die Anwesenheit von Kalk im Zellkern stellte ich mit Hilfe von Betropfen der Asche mit verdünnter Schwefelsäure fest, wonach sich sehr rasch Gipskristalle bildeten (Taf. 1 Fig. 2). Dieses war insofern schwierig, als der Mikrotropfen meistens einen größeren Abschnitt des Spodogrammes umfaßte und nicht nur die vom Zellkern herkommende Asche auflöste, sondern auch die Asche des den Zellkern umgebenden Protoplasmas. Oftmals wurden auch die mineralen Konkreme von dem Reagens recht schnell durchtränkt und das ganze Protozoen auf diese Weise durchfeuchtet. Mehr geeignet zu dieser Art von Experimenten zeigten sich diejenigen Präparate, in welchen als Folge der Veraschung oder aber der Fixierung das Protoplasma mehr zusammengezogen war und zwischen den Zellkernen und dem Protoplasma ein freier Zwischenraum bestand. Das Betropfen der ausschließlich zum Zellkern gehörenden Konkreme erleichterte ich mir noch auf die Weise, daß ich die Protozoen vor dem eigentlichen Fixierungsprozesse in destilliertes Wasser brachte, welches nach innen hin diffundierend die Protozoen aufquellen ließ. Auf diese Weise nahmen sie einige Male an Umfang zu. Das Bespritzen der einzelnen Territorien des Protoplasmas bzw. des Zellkernes auf den künstlich vergrößerten Protozoen stellte hiernach keine Schwierigkeiten mehr dar.

In den mineralen Überbleibseln des Kernes von *Paramecium* treten außer Ca und Fe noch amorphe, in Wasser unlösliche Reste auf. Voraussichtlich handelt es sich hier um Magnesium.

Neben dem Zellkern konnte man in einer ganzen Reihe von Spodogrammen noch den Mikronucleus beobachten. Dieser bildete kompakte Anhäufungen greller weißer Konkreme ohne Struktur, von runder Gestalt und scharf von der Nachbarschaft abgegrenzten Konturen (Taf. 1 Fig. 4, 5).

Protoplasma. Sowohl im Ento- wie auch im Ectoplasma des *Paramecium* kann man nach der Veraschung eine Reihe von Zell-

organoiden unterscheiden, welche mehr oder weniger reich an mineralen Substanzen sind. Die Quantität der mineralen Konkreme-
nte ist bei den verschiedenen Protozoen recht verschieden. Man kann annehmen, daß dieser Zustand bei den Tieren eher funktionell als durch Faktoren methodischer Natur bewirkt ist. Die *Paramecium*-Kulturen wurden gleichzeitig fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die einzelnen Individuen, die sich nebeneinander auf denselben Schnitten befanden, unterlagen auch dem gleichen Einfluß von Temperatur und Reagentien.

Das Hyaloplasma hinterläßt eine hellweiße Asche, die aus sehr zarten, in der Zelle recht gleichmäßig zerstreuten Körnchen besteht. In einer großen Anzahl von Präparaten waren die mineralen Konkreme-
nte des Hyaloplasmas an dem stumpfen oder spitzen Pol des Protozoen angehäuft. In dem veraschten Protoplasma kann man eine Reihe von Vakuolen beobachten, deren innerer Abschnitt meistens frei von Asche ist (Taf. 1 Fig. 4, 10 a). Sehr deutlich ist die vordere und hintere Vakuole (Taf. 1 Fig. 4). Die die Vakuolen umgebenden Hyaloplasmaanhäufungen sind hier meistens stärker als in Zwischenräumen der Vakuolen. Außer den Vakuolen kann man in den Anhäufungen des Entoplasmas zahlreiche kleine Anhäufungen einer mineralen Substanz (Taf. 1 Fig. 3, 4) von hellweißer hin und wieder von gelblicher Färbung (Fe) beobachten. Die Reaktion auf Fe fiel an diesen Stellen positiv aus. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind dies Anhäufungen von Krystallen, die in dem Protoplasma des *Paramecium* liegen, wofür auch die länglichen Konturen dieser Gebilde sprechen. Ein Teil dieser Anhäufungen kann auch recht wohl den Vakuolen entsprechen, deren Inneres eine an anorganischen Salzen reiche Substanz ausfüllte. Die Reaktionen mit Schwefelsäure weisen darauf hin, daß die mineralen Konkreme-
nte des Entoplasmas reich an Ca sind. LANSING (1938) beschrieb das Auftreten von Kalksalzen nicht im Entoplasma, sondern vor allem im Ectoplasma von *Paramecium* (Reaktionen mit Alizarinsulfat und Gallensäure-Formaldehyd). Auf Grund meiner Präparate und der von mir durchgeführten Untersuchungen mit Schwefelsäure (zahlreiche Gipskristalle) kann ich mich jedoch dieser Ansicht nicht anschließen. Wie aus den Lichtbildern 3, 4, 6, 10 a, 11 b zu ersehen ist, tritt Ca in großen Mengen sowohl im Ento- als auch im Ectoplasma auf.

Außer den mittels Schwefelsäure zu Gipskristallen umgewandelten Kalkoxyden bleibt noch von den Resten des Protoplasmas amorphe Asche zurück, in welcher aller Wahrscheinlichkeit nach Magnesium vorkommt.

Ectoplasma. Die vom Ectoplasma zurückbleibenden Konkremeute sind stark differenziert. Auf den Schnitten tritt nach der Veraschung vor allem sehr deutlich die Struktur der neuromotorischen Fasern (Taf. 1 Fig. 7 a, b, c, 5) zutage, die schon vorher bei den *Paramecium*-Spodogrammen von McLENNAN und MURER beschrieben worden sind. An dem stumpfen Pol des Protozoen fließen diese Linien in einem Punkte zusammen. Die diesen Fasern entsprechenden Anhäufungen von Mineralresten setzen sich aus sehr zarten in einer Linie gelegenen Körnchen zusammen; längs der Faser liegen in gleichen Abständen größere, weiße Körnchen (Taf. 1 Fig. 7 a). Sie entsprechen voraussichtlich den Basalkörnchen der Cilien.

Außerhalb der den Basalkörnchen entsprechenden Konkremeute liegen im Ectoplasma noch größere Ascheanhäufungen in der Gestalt von großen Körnern (Taf. 1 Fig. 8). Der Lokalisation, Größe und Gestalt nach kann man annehmen, daß diese Gebilde den noch nicht abgeworfenen Trichocysten entsprechen. Sehr reich an Mineralsalzen sind die abgestoßenen Trichocysten (Taf. 1 Fig. 9 a, b). Sie bestehen hauptsächlich aus Kalksalzen, worauf die mit Schwefelsäure an größeren Anhäufungen von abgeworfenen und von der Zelle abgesonderten Trichocysten ausgeführten Reaktionen hinweisen. Eisen konnte ich mit mikrochemischen Reaktionen in den Trichocysten nicht nachweisen.

Die Cilien lassen nach der Veraschung recht deutliche minerale Reste zurück (Taf. 1 Fig. 10 a, b).

Die Zellmembran hinterläßt in einer Reihe von Präparaten keine mineralen Reste zurück, welche sich im Spodogramm aufweisen ließen. In dieser Hinsicht stimme ich mit McLENNAN und MURER überein. Nichts destoweniger treten bei einer ganzen Reihe von Protozoen, die sich auf demselben Schnitte befinden und somit denselben Einflüssen der Fixierung und Veraschung unterliegen, auf ihrer Oberfläche recht bedeutende Konkremeute auf. Die Anhäufung dieser Salze ist oft so groß, daß sie das Bild sowohl der Basalkörper als auch der neuromotorischen Fasern gänzlich verwischen (Taf. 1 Fig. 3). Die Differenzen im Bilde der Mineralstruktur des Ectoplasmas sind meiner Ansicht nach von dem verschiedenen funktionellen Zustande des *Paramecium* abhängig.

Zusammenfassung.

Die nach der Veraschung von *Paramecium caudatum* zurückgebliebenen Mineralkonkremente entsprechen den genauen Umrissen des Protozoen. Unter Anwendung einer verbesserten Spodogramm-

untersuchungsmethode (Veraschung der Präparate auf den Deckgläschen und Untersuchung des Spodogrammes mit Hilfe der Immersionsvergrößerung) gelang es dem Verf., die Resultate der Arbeiten von McLENNAN und MURER, in welchen Mineralreste von *Paramecium* beschrieben wurden, zu bestätigen.

Verf. stellte weiterhin fest, daß die Mineralreste des Zellkernes hauptsächlich aus Kalksalzen (Darstellung von Ca mit H_2SO_4), Eisen (Reaktion mit Rodanammonium und Kalium Ferrocyanat) und wahrscheinlich aus Magnesium bestehen. Das Protoplasma von *Paramecium* enthält große Mengen von Kalk; an vielen Stellen des veraschten Protoplasmas treten größere resp. kleinere Anhäufungen von Eisen auf. Die abgeworfenen Trichocysten bestehen meistenteils aus Kalksalzen.

Die Menge der Mineralreste unterliegt bei den einzelnen Individuen sowohl im Entoplasma als auch im Ectoplasma bedeutenden Schwankungen. Man darf wohl annehmen, daß die verschiedene Menge von anorganischen Konkrementen in der veraschten Zelle von ihrem jedesmaligen Zustande abhängig ist.

An dieser Stelle gestatte ich mir, Herrn Dr. CHEJFEC für das mir überlassene Material und cand. med. Fräulein NICKELÓWNA für die Hilfe bei der Ausführung der Arbeit freundlichst Dank zu sagen.

Alle die Arbeit illustrierenden Mikrophotographien wurden mit dem Ultropak von Leitz ausgeführt. Taf. 1 Fig. 1, 9 a, b, 6 mit dem Objektiv 11, der Rest mit dem Immersionsobjektiv 75. Der den Mikrophotographien beigegebene Maßstab entstammt meiner eigenen Methode und wurde schon in der Z. wiss. Mikr. 54, 1938 beschrieben.

Literaturverzeichnis.

- GODLEWSKI, H. (1937): Quelques observations directes de processus microincineration. C. r. Soc. Sc. Varsovie. **30**.
- (1937): Mikrospopielanie jako histochemiczna metoda. Kosmos B. **62**.
- GROBICKA, J. und J. WASILEWSKA (1925): Essai d'analyse chimique quantitative de l'infusoire *Paramecium caudatum* St. Trav. Inst. Nencki. Varsovie **3**.
- KALMUS, H. (1931): *Paramecium*. Jena.
- KRUSZYŃSKI, J. (1938): Neue Ergebnisse cytochemischer Untersuchungen bei Mikroveraschung von Epithel-, Muskel- und Nervenzellen. Z. Zellf. **28**.
- LANSING, A. (1938): Localisation of calcium in *Paramecium caudat*. Science (N. Y.) **1**.
- McLENNAN, R. F. and H. K. MURER (1934): Localisation of mineral ash in the organelles and cytoplasmic components of *Paramecium*. J. of morphol. **55**.
- (1934): Localisation of mineral ash in the organelles of *Trichonympha*, a hypermastigote Flagellate from *Zootermopsis Angusticollis*. J. Morph. **56**.

- POLICARD, A. (1929): Application de la methode de la microincineration a l'etude des vorticelles. Arch. anat. micr. **25**.
- SCOTT, G. H. (1933): A critical study and review of the method of microincineration. *Protoplasma* **20**.
- SCOTT, G. H. and E. S. HORNING (1932): The structure of opalinids, as revealed by the technique of microincineration. *J. Morph.* **53**.

Tafelerklärung.

Taf. 1.

Fig. 1. *Paramecium* künstlich vergrößert durch Verhalten in destilliertem Wasser vor der Fixierung. Präparat verascht. Deutlich sichtbar der an Mineralsalzen reiche Zellkern (K') und die neuromotorischen Fasern.

Fig. 2. Aus den vom Zellkern herstammenden Sedimenten erhaltene Gipskristalle (Reaktion mit H₂SO₄ und Ca).

Die Mikrophotographie umfaßt nicht das ganze Protozoon.

Fig. 3. Anhäufungen von Mineralsalzen im Entoplasma (En) und Ectoplasma (Ek). — freie Fläche neben dem infolge der Fixierung zusammengeschrumpften Zellkerne.

Fig. 4. Anhäufungen von Mineralsalzen im Entoplasma und Mikronucleus (K'').

Fig. 5. Vom Mikronucleus (K''), den schräg durchschnittenen neuromotorischen Fasern (n), den Vakuolen (V), dem Ectoplasma (Ek) und dem Entoplasma (En) zurückgebliebene Mineralreste.

Fig. 6. Von den Vakuolen (V) und den neuromotorischen Fasern übriggebliebene Mineralreste.

Fig. 7 a, b und c. Das neuromotorische System von *Paramecium* nach der Veraschung.

Fig. 8. Anhäufungen von Mineralsalzen im Ectoplasma von *Paramecium*, die den nicht geplatzen Trichocysten entsprechen.

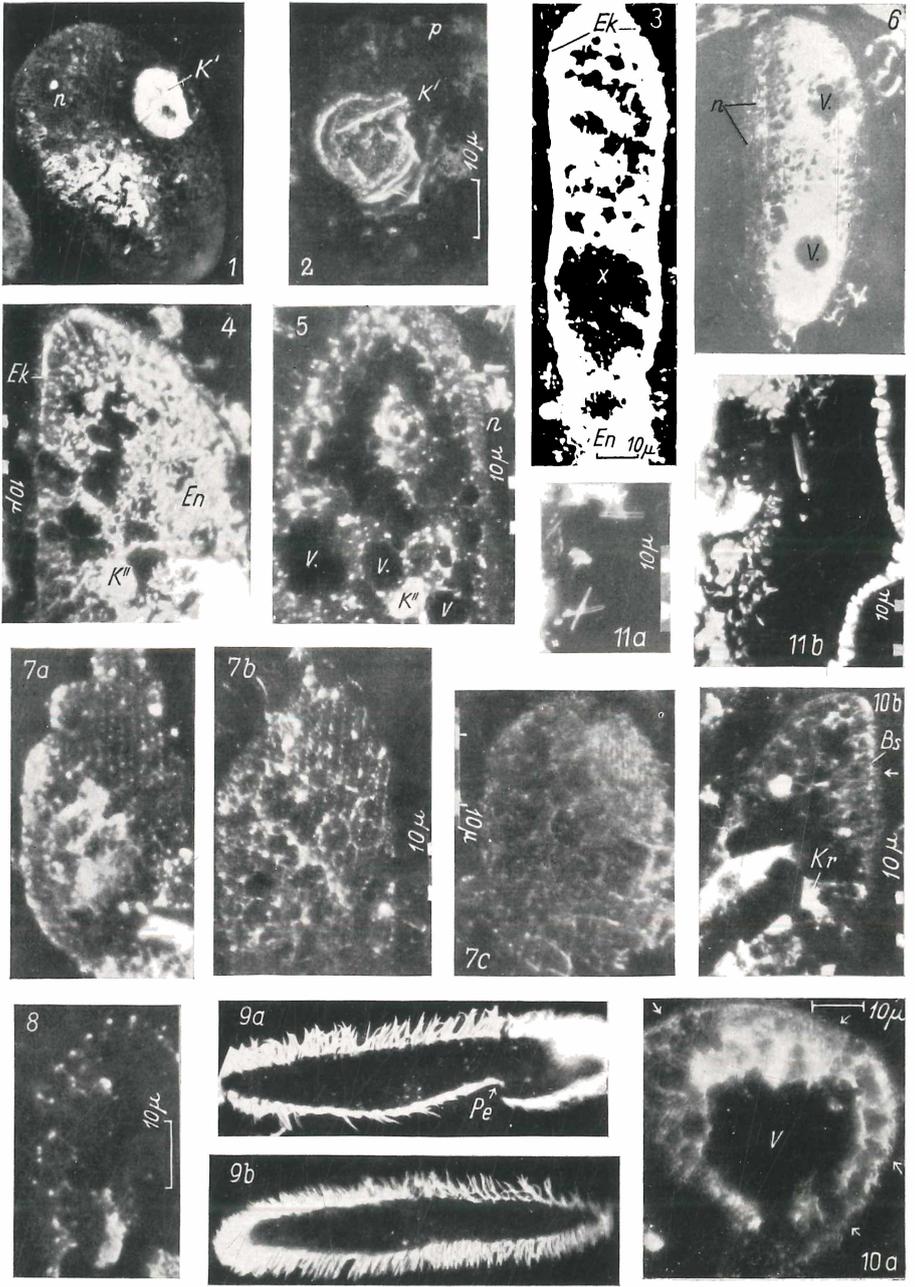
Fig. 9 a und b. Verashtes *Paramecium* mit geplatzen Trychocysten. Die von dem Protozoon selbst zurückgebliebenen Sedimente sind auf den Bildern nicht sichtbar. (Pe)-peristom.

Fig. 10 a und b. Von den Cilien (↑), den Basalkörpern (Bs), und den im Entoplasma liegenden Kristallen (Kr) zurückgebliebene Mineralreste.

Fig. 11. Aus Protoplasmasedimenten des *Paramecium* erhaltene Gipskristalle (Reaktion mit H₂SO₄ und Ca).

Erklärungen der Zeichen bei den Figuren.

n = Neuromotorische Fasern,	Ek = Ectoplasma,
P = Protoplasma,	Pe = -Peristom,
K' = Macronucleus,	C = Cilien,
K'' = Micronucleus,	Bs = Basalkörper,
V = Vakuolen,	Kr = Kristalle.
En = Entoplasma,	



Kruszynski phot.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1939

Band/Volume: [92 1939](#)

Autor(en)/Author(s): Kruszyński J.

Artikel/Article: [Mikrochemische Untersuchungen des veraschten Paramecium caudatum. Verteilung von Kalk und Eisen in der Zelle. 1-9](#)