

Pesquizas sobre a *Polytomella agilis* n. g., n. sp.

PELO

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistente.

(Com Estampa 3.)

Untersuchungen ueber *Polytomella agilis* n. g., n. sp.

VON

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistenten am Institute.

(Hierzu Tafel 3.)

No decurso de pesquisas sobre os protozoarios de agua doce no Instituto, nestes ultimos tempos, muito frequentemente tivemos ocazião de vêr desenvolver em nossas cubas de cultura, entre numerozas outras fórmãs, um flajelado, assaz interessante, com cujo estudo nos ocupámos durante algum tempo.

Constitue motivo do prezente trabalho, o resultado das observações então feitas, sobre a morfologia e biologia do flajelado, durante as quais tivemos sempre a felicidade de poder dispôr dos eruditos conselhos do emiñente protozoolojista e nosso mestre o Dr. S. v. PROWAZEK ao qual aqui deixamos rejistrados os nossos melhores e mais sinceros agradecimentos.

MATERIAL E TECNICA.

O flajelado foi encontrado diversas vezes nas cubas em que colocavamos agua doce de diferentes poços e pequenas fontes das vizinhanças do Instituto, com o fim de obter culturas dos diversos protozoarios dessas aguas. Quando o flajelado em questão aparecia nas culturas geralmente se tornava, desde os primeiros dias, muito abundante, sendo então bastante facil izo-

Während der Untersuchungen, welche an diesem Institute in letzter Zeit über Süßwasserprotozoen angestellt wurden, hatte ich sehr häufig Gelegenheit, in Kulturgefäßen neben zahlreichen anderen Formen eine sehr interessante Flagellatenart auftreten zu sehen, deren Studium ich einige Zeit gewidmet habe. Das Resultat der dabei gemachten Beobachtungen über die Morphologie und Biologie dieses Flagellaten bildet den Gegenstand vorliegender Arbeit; bei diesen Untersuchungen stand mir immer die sachkundige Beratung meines Lehrers, des hervorragenden Protozoenforschers Dr. S. v. PROWAZEK, zur Verfügung, dem ich hierfür meinen besten und aufrichtigsten Dank ausspreche.

MATERIAL UND TECHNIK.

Das Flagellat wurde mehrere Male in den Gefäßen gefunden, in welchen ich Wasser aus verschiedenen Quellen und Tümpeln aus der Nähe des Institutes aufbewahrte, um Kulturen der darin enthaltenen Protozoen zu gewinnen. Wenn dasselbe in den Kulturen auftrat, vermehrte es sich in der ersten Tagen so reichlich, dass es ziemlich leicht gelang, nach der gewöhn-

lal-o em cultura pura em infusão de folhas de couve, seguindo a tecnica habitual. Nestas culturas elle prolifera abundantemente e nellas se tem esplendido recurso para o seu estudo. E' de toda a vantajem trabalhar com culturas puras, porque, sendo o flajelado, á primeira vista, muito semelhante a uma *Polytoma*, em cuja companhia muitas vezes prolifera, torna-se possivel a confusão de um com outro protozoario, quando presentes na mesma cultura.

Nas culturas permanecem por muito tempo vivos os flajelados. E', porém, nas recentes que se observam em melhores condições as diferentes fazes do desenvolvimento que nelles é, então, mais regular e menos sujeito a dejenerações. Não são, porém, sem vantajem as culturas um pouco antigas. De um módo geral se póde dizer que nos primeiros dias de cultura se observam melhor as fazes de divizão do protozoario e que já as mais idozas se prestam particularmente ao estudo da copulação e do encistamento. O estudo do flajelado foi feito, tanto a fresco, como nas preparações fixadas. Para o exame a fresco muito se recomenda o emprego da gota pendente ou da camara humida; as preparações entre lamina e laminula, ao contrario, são pouco utilizaveis, porque nella rapidamente morre o flajelado á mingua de oxijenio. As colorações vitais escasso recurso oferecem ao estudo do protozoario, pois as materias córantes, *Neutralrot*, azul de metilenio, *Brillantkresilblau* só manifestam as suas propriedades córantes depois da morte do organismo.

Para o estudo da *Polytomella* em preparados fixados, o metodo que melhor resultado ofereceu, foi o de fazer preparados totais em laminulas cobertas préviamente com ligeira camada de albumina e que tendo ainda o material humido, eram lançadas no liquido fixador. As soluções fixadoras por nós mais frequentemente uzadas, foram o sublimado-alcool e o liquido de FLEMING; o formol, o liquido de HERMANN, o sublimado-acetico tambem foram experimentados, porem, com resultado não supe-

lichen Technik eine Reinkultur in einer Infusion von Kohlblättern zu erhalten. In diesem Medium vermehrt er sich sehr reichlich und bietet die günstigsten Bedingungen für seine Erforschung. Die Verwendung von Reinkulturen ist von wesentlichem Vorteile, da sich häufig zugleich mit unserem Flagellaten eine *Polytoma* entwickelt, welcher er auf den ersten Blick sehr ähnlich sieht, so dass eine Verwechslung beider Protozoen möglich wird, wenn sie sich in derselben Kultur vorfinden.

In den Kulturen erhalten sich die Flagellaten lange Zeit lebendig; doch bieten frisch angelegte die besten Bedingungen für die Beobachtung der verschiedenen Phasen der Entwicklung, welche dann regelmässiger vor sich gehen und weniger Degenerationen unterworfen sind; immerhin haben auch etwas ältere Kulturen ihre Vorteile. Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Teilungsphasen am besten in den ersten Tagen der Kulturen beobachtet werden, während die älteren sich mehr für das Studium der Kopulation und der Incystierung eignen.

Die Flagellaten wurden zum Teil lebend, zum Teil an fixierten Präparaten untersucht. Für den ersteren Fall empfiehlt sich die Anwendung des hängenden Tropfens oder der Camara humida; dagegen sind Präparate mit aufgelegtem Deckglase weniger zu gebrauchen, da in solchen die Flagellaten durch Sauerstoffmangel rasch absterben. Vitalfärbungen bieten beim Studium der Protozoen geringen Nutzen, da die Farbstoffe Neutralrot, Methylenblau und Brillantkresylblau ihre färbende Eigenschaft erst nach dem Tode des Organismus zeigen.

Beim Studium der *Polytomella* an fixierten Präparaten erhielt ich die besten Resultate, wenn Gesamtpräparate auf Deckgläschen, die zuvor mit einer dünnen Albuminschicht überzogen waren, hergestellt und noch feucht in die Fixierflüssigkeit geworfen wurden. Als solche wandte ich am häufigsten Sublimatalkohol und FLEMING'sche Flüssigkeit an; auch For-

rior ao dos liquidos mencionados em primeiro lugar. Tambem uzámos de preparados fixados, depois de secos pelos alcoes absoluto e metilico para as colorações pelo GIEMSA.

A incluzão do material e o seu estudo em córtes mostrou-se de mediocre vantajem.

O metodo de colorações mais apropriado ao estudo da estrutura pelas minucias que oferece é incontestavelmente a hematoxilina férrea, segundo HEIDENHAIN ou MALLORY. A hematoxilina de BOEHMER e a de GRENACHER não revelam com tanta nitidez os finos pormenores de estrutura e o GIEMSA quazi que só encontra emprego no estudo da estrutura dos flajelos.

SISTEMATICA.

A' primeira vista, o flajelado que estudamos, muito se aproxima de uma *Polytoma* pelo aspeto geral; della se destingue logo porem, por não possuir membrana envolvente, ter quatro flajelos, ao em vez de dois e pela auzencia de entozoma no nucleo, além de outros caractéres em relação com a biolojia entre os quais avulta o processo de divizão, totalmente diferente nos dois protozoarios.

A' medida que formos descrevendo a morfolojia do flajelado e relatando a sua biolojia, ir-se-ão acentuando essas diferenças; por agóra, não é necessario entrar em maiores minucias a seu respeito. Diverjindo o flajelado das politomas e, por outro lado, não sendo possivel identifical-o com os demais generos conhecidos, forçozo se tornou criar novo genero que denominámos « *Polytomella* » de que fica sendo tipo com a denominação especifica « *agilis* ».

O novo genero, pensamos, deve ser incluído entre os que constituem a familia das *Amphimonadaceae* na classificação de flajelados segundo SENN.

MORFOLOJIA.

O corpo da *Polytomella* tem geralmente a fórmula de um ovoide bastante regular, não raro porém, de fórmula alongada.

mol, HERMANN'sche Flüssigkeit und Sublimat mit Essigsäure wurden erprobt, doch war das Resultat nicht besser, als bei den erst erwähnten Gemischen. Für die Färbung nach Giemsa verwandte ich auch Präparate, welche nach dem Antrocknen in absolutem oder Methyl-Alkohol fixiert wurden.

Einbettung des Materiales und Schneiden desselben bot für das Studium nur geringe Vorteile.

Zum Studium der Struktur eignet sich wegen der Details, die sie erkennen lässt, unzweifelhaft am besten die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN oder MALLORY. BOEHMER'sches und GRENACHER'sches Hämatoxylin zeigen die feineren Einzelheiten nicht mit derselben Deutlichkeit und die GIEMSAFärbung findet fast nur zum Studium der Geißelstruktur Verwendung.

KLASSIFICATION.

Das von mir studierte Flagellat erscheint beim ersten Anblick in seiner Gesamterscheinung einer *Polytoma* sehr ähnlich; doch unterscheidet es sich von derselben sofort dadurch, dass er vier statt zwei Geißeln, dagegen keine Hüllmembran und im Kerne kein Entosom besitzt, abgesehen von anderen biologischen Charakteren, unter welchen der ganz verschiedene Teilungsprocess oben ansteht. Im Verlaufe der morphologischen und biologischen Beschreibung treten diese Unterschiede deutlich zu Tage, so dass es für den Augenblick überflüssig ist, in weitere Einzelheiten einzutreten.

Da sich dieses Flagellat einerseits von *Polytoma* unterscheidet und andererseits auch mit anderen bekannten Gattungen nicht identificieren lässt, war es nötig, für denselben ein neues Genus aufzustellen; ich nenne dieses *Polytomella* und die typische Species *agilis*. Ich glaube, dass die neue Gattung in der von SENN (Pflanzenfamilien, Bd. 1) aufgestellten Flagellatenklassifikation den *Amphimonadinen* zugewiesen werden muss.

Na extremidade mais alargada que é a anterior, apresenta o flajelado um pequeno rostrilho sob a fôrma de calota membranoza que se aplica sobre restrita zona dessa porção do protozoario.

O corpo da *Polytomella* é constituído por uma massa de protoplasma desprovida de membrana, no interior da qual se encontram o nucleo, numerosas granulações e vacuolos pulsateis. Da porção anterior do corpo, logo abaixo do rostrilho, nascem quatro flajelos iguais, dirigidos para diante, que asseguram a mobilidade ao protozoario.

O comprimento da *Polytomella* é, em média, de 17 μ incluído o rostrilho; a largura atinge 8 μ . A seguir passamos á descrição por menor de cada elemento constituinte do corpo da *Polytomella*; antes, porém, chamamos a atenção para as Fig. 1 e 21 da Estampa 3 que facilitam a compreensão da estrutura do flajelado.

PROTOPLASMA.

A *Polytomella* possui um protoplasma de estrutura alveolar, de colorido amarelo palido, pouco refrinjente, apresentando largas malhas, mais abundantes na porção posterior do corpo, e uma estrutura mais delicada na região que fica para diante do nucleo. Em torno ao nucleo e na periferia do flajelado pôde observar-se uma orla de alveolos regulares.

A *Polytomella* não possui membrana e apenas uma orla de protoplasma mais condensada e de estrutura fibrilar constitue o limite externo do corpo.

As malhas do protoplasma, acima citadas, são ocupadas por numerosos microgranulos, muito refrinjentes de côr amarela clara, pouco abundantes, arredondados nas fôrmas tenras do protozoario e que, com a idade se transformam em curtos bastonetes fuziformes, cujo numero aumenta, e finalmente, todo o protoplasma fica cheio delles. A substancia dessas granulações córa-se em pardo violeta pelo iodo, a frio; aquecida

MORPHOLOGIE.

Der Körper der *Polytomella* zeigt gewöhnlich eine ziemlich regelmässige Eiform, doch ist er nicht selten in die Länge gezogen. An dem breiteren Vorderende zeigt sie einen kleinen Rüssel in der Form einer haubenförmigen Membran, welche einer beschränkten Zone dieser Gegend aufsitzt. Der Körper der *Polytomella* besteht aus einer membranlosen Protoplasma-masse, welche einen Kern, zahlreiche Granulationen und pulsierende Vacuolen einschliesst. Am Vorderende des Körpers, gleich unter dem Rüssel, entspringen vier gleich lange, nach vorn gerichtete Geisseln, welche diesem Protozoen die Beweglichkeit verleihen.

Die Länge des Protozoen beträgt im Mittel einschliesslich des Rüssels 17 μ , die Breite erreicht 8 μ .

Bevor ich auf eine genauere Beschreibung der einzelnen Elemente eingehe, welche den Körper der *Polytomella* bilden, verweise ich auf die Figuren 1 und 2 der Tafel 3, welche das Verständnis der Struktur dieses Flagellaten erleichtern sollen.

PROTOPLASMA.

Die *Polytomella* besitzt ein Protoplasma von alveolärer Struktur, welches blass-gelb gefärbt und wenig lichtbrechend ist; es zeigt weite Maschen, welche in der hinteren Hälfte des Körpers reichlicher auftreten, und eine zartere Struktur in der vor dem Kerne gelegenen Region. Um den Kern und in der Peripherie des Flagellaten beobachtet man einen Saum von vier-eckigen Alveolen. Eine Membran ist nicht vorhanden und der Körper wird nach aussen nur von einem Saume verdichteten Protoplasmas von fibrillärer Struktur begrenzt.

Die bereits angeführten Protoplasma-maschen enthalten in grosser Zahl kleine, stark lichtbrechende, hellgelbe Körnchen; in den jungen Formen sind sie spärlich und rund, verwandeln sich aber mit zunehmendem Alter in kurze spindelförmige Stäb-

adquire coloração avermelhada, não é solúvel na água, no álcool, no éter, no clorofórmio e no xilol; a ação prolongada da saliva impede a reação do iodo; ella apresenta, em suma, caracteres que a fazem aproximar do paraglicógeno.

NUCLEO.

O nucleo acha-se colocado no interior do protoplasma, a meia distancia das extremidades do flajelado. A fresco aparece sob a fórma de pequena vezicula, um pouco menos refrinjente que o protoplasma. Nos preparados córados, e melhor ainda nos a fresco, se percebe a sua estrutura. Verifica-se então que é constituído da seguinte fórma: em primeiro lugar apresenta uma membrana nitida, de duplo contorno que o limita externamente e em cuja parede interna se vêem applicadas pequenas massas de cromatina equidistantes e que formam um revestimento e membrana. A esta camada de cromatina segue-se uma zona de substancia acromatica que a izola do cariozoma. Este se apresenta sob a fórma de pequeno corpusculo esferico, pouco refrinjente a fresco e intensamente córado nos preparados fixados e tratados pela hematoxilina. No interior do cariozoma ainda se póde observar, a fresco, a presença de pequeno centriolo. O cariozoma não se acha livre no interior do nucleo; delgadas fibrilas de substancia acromatica ligam-no á parede interna da membrana nuclear e mantem-no constantemente na mesma posição, no centro do nucleo. De tal modo constituído o nucleo da *Polytomella* apresenta duas porções distintas, uma periferica, a das massas de cromatina que se applicam á membrana, outra central ou cariozomica. São ambas constituídas por substancia comparavel á cromatina nuclear e goza cada uma de autonomia que se revela com toda a nitidez por ocasião da divizão, durante a qual se revela o tipo binuclear do protozoario. Tem-se então a impressão de que no nucleo da *Polytomella* ha constituição dupla como se houvesse um nucleo encaixado dentro do outro.

chen, deren Zahl zunimmt, bis sie zuletzt das ganze Protoplasma ausfüllen. Mit Jod behandelt färben sie sich in gewöhnlicher Temperatur violettbraun, beim Erhitzen nehmen sie eine rötliche Färbung an; in Wasser, Alkohol, Ether, Chloroform und Xylol sind sie unlöslich. Eine längere Einwirkung von Speichel hebt die Jodreaction auf; kurz, sie zeigen Eigenschaften, welche sie als dem Paraglycogen nahe stehend charactersieren.

KERN.

Der Kern befindet sich im Innern des Protoplasmas, von beiden Körperenden des Flagellaten gleich weit entfernt. Im frischen Präparate erscheint er als ein kleines, etwas weniger lichtbrechendes Bläschen; nach der Färbung tritt seine Struktur deutlicher hervor und man erkennt nachfolgende Zusammensetzung: In erster Linie zeigt er eine scharf umschriebene, doppelt kontourierte Membran, welche ihn nach aussen begrenzt; ihrer Innenseite liegen in gleichen Abständen kleine Chromatinmassen an. Auf diese Chromatinschicht folgt eine Zone achromatischer Substanz, welche sie vom Caryosom trennt. Dieses zeigt die Form eines kleinen runden Körperchens und erscheint in frischem Zustande wenig lichtbrechend, in fixierten und mit Hämatoxylin gefärbt Präparaten dagegen intensiv gefärbt; im ersteren Falle erkennt man noch die Gegenwart eines kleinen Centriols. Das Caryosom liegt im Innern des Kernes nicht frei, sondern durch zarte Fasern achromatischer Substanz mit der Innenseite der Kernmembran verbunden und in seiner Lage in der Mitte des Kernes fixiert. Demgemäss bietet der Kern der *Polytomella* zwei verschiedene Teile, von denen der periphere durch die der Membran angelagerten Chromatinmassen repräsentiert wird; der andere ist central und entspricht dem Caryosom. Beide bestehen aus einer Substanz, welche dem Kernchromatin entspricht und sind gegenseitig unabhängig, wie dies ganz deutlich bei Gelegenheit der Teilung zu

Este tipo nuclear tão curiozo não parece raro, nós já o encontrámos na *Amoeba diplomitotica* (1906) e também em uma especie de *Bodo saltans* e é provavel que ainda se apresente em muitos outros protozoarios. Tal estrutura nuclear parece-nos de bastante importancia, pois é carateristica da binucleidade dos protozoarios.

FLAJELOS.

O numero normal de flajelos da *Polytomella* é de quatro que se orijnam de outros tantos corpusculos bazais, dispostos crucialmente, na extremidade anterior do corpo, no limite entre esta e o rostrilho, cuja porção periférica é atravessada pelos flajelos. Delgadas fibrilas rizoplasticas em numero de quatro, geralmente pouco apparentes, estabelecem ligação entre os corpusculos bazais e o nucleo.

Os flajelos são iguais, dirigidos todos para diante, medem cerca de 22μ de comprimento e têm estrutura homojenia.

VACUOLOS PULSATEIS.

A *Polytomella* apresenta dois vacuolos pulsateis colocados, um ao lado do outro, na extremidade anterior do corpo, logo abaixo do rostrilho e de cada lado da linha mediana. Estes vacuolos pulsam alternativamente, com pequeno intervalo e não excedem, quando completamente cheios, a 2 ou 3μ de diametro.

ROSTRILHO.

O rostrilho da *Polytomella* tem a fórma de pequena calota membranoza, transparente, aplicada á extremidade anterior do flajelado. A fórma varia bastante; ora se apresenta muito saliente, ora achatado; nas fórmas mais regulares orça o seu diametro por 2μ e a largura não excede a 4μ . No interior do rostrilho organ algum; apenas a sua periferia dá passagem aos flajelos, que, como já vimos, nacam logo abaixo delle.

Tage tritt, welche den binucleären Typus der *Polytomella* beweist. Man hat dann den Eindruck, dass ihr Kern eine doppelte Constitution zeigt, wie wenn ein Kern im andern eingeschachtelt wäre.

Dieser merkwürdige Kerntypus scheint nicht selten, denn ich habe ihn bereits bei der *Amoeba diplomitotica* und einem *Bodo* vom Typus des *Saltans* beobachtet; wahrscheinlich findet er sich noch bei vielen anderen Protozoen. Eine solche Struktur erscheint mir sehr bedeutsam, weil sie die Doppelkernigkeit der Protozoen charakterisiert.

GEISSELN.

Die Zahl der Geisseln der *Polytomella* beträgt in der Regel vier und sie entspringen von ebensovielen Basalkörperchen, welche kreuzweise am Vorderende des Körpers, an der Grenze zwischen diesem und dem Rüssel, liegen, wobei der Rand des letzteren von den Geisseln durchsetzt wird. Vier zarte und gewöhnlich wenig deutliche Rhizoplastfasern vermitteln die Verbindung der Basalkörperchen mit dem Kerne. Die Geisseln sind gleich lang, nach vorn gerichtet, ca. 22μ lang und von homogener Struktur.

PULSIERENDE VACUOLEN.

Die *Polytomella agilis* zeigt zwei pulsierende Vacuolen, welche nebeneinander am Vorderende des Körpers gelegen sind und zwar zu beiden Seiten der Mittellinie dicht hinter dem Rostellum. Sie pulsieren abwechselnd in kurzen Zwischenräumen und überschreiten auch bei vollständiger Füllung den Durchmesser von $2-3 \mu$ nicht.

ROSTELLUM.

Das Rostellum der *Polytomella* hat die Form eines durchsichtigen membranösen Kugelabschnittes, welcher dem Vorderende des Flagellaten angefügt ist. Seine Form wechselt beträchtlich, indem es sich bald vorspringend, bald abgeflacht präsentiert; in der regelmässigsten Form beträgt

BIOLOGIA.

O movimento de *Polytomella agilis*, graças á ação conjunta dos quatro flajelos que possui, é extremamente vivo, rápido e variável; ora o protozoário se desloca em linha réta, ora mais frequentemente com pequenas digressões para um lado ou para outro, mudando a cada momento de rumo. Enquanto se desloca o flajelado vibra quasi constantemente e gira sobre seu eixo longitudinal.

Curioso fato se observa nas culturas já um pouco velhas e com certa tendencia ao encistamento, quando examinadas em gota pendente. Nota-se, então, que o flajelado depois de intensa serie de movimentos, se fixa pelo rostrilho, por algum tempo, á laminula por uma especie de tigmotropismo, e aí executa em torno de seu eixo, uma serie de rapidissimos movimentos rotativos, que interrompe subitamente, ao cabo de algum tempo abandona o ponto a que se fixava e segue em direção qualquer, para mais adiante reproduzir o mesmo fato. Embora este fenomeno seja observado nos periodos de preencistamento do flajelado, é difficil dizer qual a relação que existe entre um e outro.

Durante o movimento livre não se nota alteração alguma na fórma do protozoário; quando, porem, se fixa pelo rostrilho á laminula para executar os movimentos acima referidos, ás vezes seu contorno transverso, normalmente circular, aparece, em seção, com a fórma de quadrangulo, irregular, de lados arredondados.

A alimentação da politomela processa-se exclusivamente por via osmotica, porquanto nenhuma abertura bucal, nem tão pouco vacuolos alimentares se notam no protozoário; muito pouco resistente ás influencias termicas é o flajelado; já a 45° cessam seus movimentos, morrendo elle se esta temperatura atúa prolongadamente ou, em pouco tempo, se é elevada a 50°.

A luz não parece influenciar prejudicialmente o protozoário, cujas condições vi-

sein Durchmesser ca. 2 μ und seine grösste Breite nicht mehr als 4 μ . Im Innern desselben defindet sich kein Organ, während es an seiner Peripherie die Geisseln durchtreten lässt, welche, wie bereits angegeben, dicht unter demselben entspringen.

BIOLOGIE.

Die Bewegung der *Polytomella agilis* ist in Folge der vier Geisseln, welche sie besitzt, äusserst lebhaft, beschleunigt und wechsellvoll; bald verschiebt sich der Organismus in gerader Linie, bald und noch öfters mit kleinen Abweichungen nach der einen oder anderen Seite, indem er jeden Augenblick seine Richtung ändert. Während der Bewegung vibriert die Geissel fast beständig und dreht sich um ihre Längsaxe.

In alten Kulturen, die einige Tendenz zur Incystierung zeigen, beobachtet man im hängenden Tropfen ein merkwürdiges Faktum; man sieht nämlich, wie das Flagellat nach einer Reihe von intensiven Bewegungen sich für einige Zeit mit dem Rostellum am Deckglas fixiert (durch eine Art Tygmotropismus) und hier eine Reihe von äusserst raschen Drehbewegungen um seine eigene Axe ausführt; nach einiger Zeit unterbricht er dieselben plötzlich, verlässt seinen Fixationspunkt und bewegt sich in einer beliebigen Richtung, woselbst sich dieselbe Erscheinung wiederholt. Obwohl man diesen Vorgang in der Periode vor der Incystierung beobachtet, ist es schwierig die Beziehungen zu erklären, welche zwischen den beiden bestehen. Während der freien Bewegungen bemerkt man keine Veränderung der Form des Protozoen; wenn er sich aber mit dem Rüssel am Deckglas fixiert, um die beschriebenen Bewegungen auszuführen, erscheint er in seinem Querschnitt, der in der Regel rund ist, manchmal in Form eines unregelmässigen Vierecks mit abgerundeten Seiten.

Die Ernährung der *Polytomella* findet ausschliesslich auf osmotischen Wegen statt, da man an derselben weder eine Mundöffnung, noch Nahrungsvakuolen

tais se mantem as mesmas, quer seja exposto ou abrigado della.

O oxigenio é um elemento essencial ao flajelado que morre rapidamente quando delle privado. Nos preparados a fresco, entre lamina e laminula, é nas bordas e em torno ás bolhas de ar que os flajelados se acumulam, daí se movendo com toda a rapidez, ao passo que sucumbem, nos pontos privados de ar, ao cabo de muito pouco tempo.

As cores vitais, o *Neutralrot*, o azul de metilenio etc. não têm influencia sobre o protoplasma ou o nucleo do protozorio quando vivo. Nelle só as granulações do protoplasma se córam e quando a coloração invade a celula é sinal de que esta perdeu a vitalidade.

Os venenos celulares atúam muito violentamente sobre o flajelado; a saponina mata-o quazi instantaneamente, a bile, o oleato e o taurocolato de sodio dissolvem-n'o rapidamente, não deixando intatas senão as granulações do protoplasma. Nenhum vestijio de membrana pode ser visto como residuo dos flajelados dissolvidos pelos venenos.

DIVIZÃO.

A *Polytomella*, não fazendo exeção aos demais flajelados, se divide lonjitudinalmente. Os fenomenos de divizão têm inicio no nucleo e só quando neste, as fazes já vão um tanto adiantadas é que começa a segmentação do protoplasma. A divizão nuclear da *Polytomella*, incontestavelmente a parte mais interessante do processo de segmentação, dá-se por mitoze, ou melhor, por processo de dupla mitoze em que tomam parte independente, de um lado as porções de cromatina periférica, e de outro o cariozoma sob a ação diretriz comum do centriolo, funcionando como centrozomio de um metazoario.

O carateristico da dupla mitoze é a constituição de cromozomios cariozomicos e

erkennt. Das Tier ist gegen thermische Einflüsse wenig resistant; schon bei 45° hören die Bewegungen auf, wenn diese Temperatur längere Zeit einwirkt; steigt sie auf 50°, so erfolgt dasselbe sehr bald. Das Licht scheint keinen nachteiligen Einfluss zu haben, da die Lebenserscheinungen sich nicht ändern, wenn es demselben ausgesetzt oder im Dunkel gehalten wird.

Der Sauerstoff ist für diesen Organismus ein notwendiges Element, da er bei Mangel desselben rasch abstirbt. In Deckglaspräparaten häufen sich die Individuen an den Rändern und um die Luftblasen an, wobei sie sich mit voller Geschwindigkeit bewegen, während sie an den Punkten, wo sie der Luft beraubt sind, nach kurzer Zeit absterben.

Die zur Vitalfärbung benutzten Farbstoffe: Neutralrot, Methylenblau etc. haben während des Lebens keinen Einfluss auf Protoplasma und Kern. Es färben sich dann nur die Granula des Protoplasmas und wenn die Färbung die Zelle selbst erreicht, ist es ein Zeichen des Absterbens.

Die Zellgifte haben auf den Flagellaten eine sehr heftige Wirkung; Saponin tötet ihn fast augenblicklich, Galle, ölsaures und taurocholsaures Natron lösen ihn rasch auf und lassen nur die Protoplasma-granula unverzehrt. Nach der Anflösung durch die Gifte bleibt keine Spur einer Membran sichtbar.

TEILUNG.

Die *Polytomella* bildet keine Ausnahme unter den Flagellaten und teilt sich längsweise. Die Teilungerscheinungen beginnen am Kerne und erst, wenn sie an diesem einigermaßen vorgerückt sind, beginnt die Segmentation des Protoplasmas.

Die Kernteilung der *Polytomella* bildet ohne Zweifel den interessantesten Teil des Teilungsprozesses; sie erfolgt durch Mitose oder richtiger durch einen Vorgang doppelter Mitose, an dem einerseits die peripherischen Chromatinteile, andererseits das Caryosom, von einandern unabhängig, aber unter gemeinsamen Einfluss des Cen-

periféricos que se orientam uns apoz outros em direção aos polos de um mesmo fuзо.

O primeiro indicio da divizão nuclear na *Polytomella* manifesta-se pela dispozição irradiante, em torno ao cariozoma, que tomam as pequenas massas de cromatina, aplicadas á porção interna da membrana e que aparecem então muito nitidas, podendo-se contar até 12 pequenos bastonetes (Est. 3, Fig. 2). Logo em seguida se observa a fragmentação do cariozoma em pequenos bastonetes, cujo numero é difficil de apreciar e que, reunidos á porção de cromatina periférica, formam, no interior do nucleo, de que então desaparece a membrana, um agrupamento unico onde se não pode distinguir quais os elementos de uma, quais os de outra origem. (Est. 3, Fig. 2).

Em faze ulterior do processo, os cromozomios orijinaes da divizão do cariozoma aparecem com dispozição transversal em filas paralelas, perpendicularmente ás quais vão procurando se orientar os cromozomios perifericos (Est. 3, Fig. 4). Até esta faze nenhum indicio se tem da formação de fuзо; a seguir, porém, aparece constituido um fuзо muito nitido, cujo eixo é formado pelos cromozomios cariozomicos dispostos sob a fôrma de pequena faixa, em torno á qual, na parte média, se dispõem constituindo pequena placa equatorial, os cromozomios perifericos ligados aos polos do fuзо por delicados filamentos acromaticos (Est. 3, Fig. 5).

Nestes primeiros periodos do processo de divizão o centriolo é pouco perceptivel e não se póde verificar com clareza as transformações que elle sofre; pelo que, porém, se observa, a seguir, não fica elle inativo e tambem se divide, muito provavelmente por mitoze.

Constitue um periodo mais adiantado do processo de segmentação do flajelado, a divizão da faixa cariozomica da faze precedente, pelo meio, perpendicularmente ao eixo e o afastamento das duas porções que se vão colocar nos pólos do fuзо sob a fôr-

triols, teilnehmen, indem letzteres die Funktion des Centrosoms der Metozoen übernimmt.

Die doppelte Mitose kennzeichnet sich durch die Bildung von peripherischen und Caryosom-Chromosomen, welche sich hinter einander anordnen, in der Richtung nach den Polen derselben Spindel; die ersten Anzeichen der Kernteilung äussern sich bei der *Polytomella* durch die strahlige Anordnung, welche die kleinen, der Membran inwendig anliegenden, Chromosomen um das Caryosom annehmen; sie erscheinen dann sehr deutlich und man kann bis zu zwölf kleine Stäbchen zählen (Tafel 3, Fig. 2). Kurz darauf beobachtet man eine Fragmentation des Caryosoms in kleine Stäbchen, deren Anzahl schwer zu erkennen ist; in Verbindung mit derjenigen der peripherischen Chromatinportion, bilden sie im Innern des Kernes, dessen Membran jetzt verschwindet, eine gemeinsame Gruppe, in welcher die Elemente verschiedenen Ursprungs sich nicht unterscheiden lassen. (Tafel 3, Fig. 3).

Dagegen erscheinen bei einer weiteren Phase, die bei der Teilung des Caryosoms gebildeten Chromosomen in transversaler, von parallelen Reihen gebildeter Anordnung, während sich die peripheren Chromosomen senkrecht zu denselben zu ordnen suchen (Tafel 3, Fig. 4).

Bis zu dieser Phase findet man keine Anzeichen einer Spindelbildung; es folgt nun aber die Bildung einer deutlichen Spindel, deren Axe durch Caryosom-Chromosomen gebildet wird, welche in der Form eines kleinen Bandes geordnet sind, um welches in der Mitte sich die peripherischen Chromosomen zu einer kleinen Aequatorialplatte anordnen, welche mit den Polen der Spindel durch zarte achromatische Fäden verbunden ist (Tafel 3, Fig. 5).

Bei diesen ersten Phasen der Kernteilung ist das Centriol schwer zu erkennen und seine Veränderungen lassen sich nicht deutlich verfolgen; doch zeigen die späteren Beobachtungen, dass es nicht untätig bleibt, sondern sich, wahrscheinlich amitotisch, teilt.

ma de dois pequenos cones, separados entre si por um filamento mais escuro, que é o filamento de união dos centriolos. Nenhuma alteração se nota na placa de cromozomios perifericos (Est. 3, Fig. 6). Os pequenos cones de natureza cariozomica, colocados nos pólos do fuzo, não raro já neste periodo da divizão, perdem essa fórmula e apresentam-se então com o aspéto de pequenas placas polares; geralmente, porém, é esta transformação mais tardia. (Est. 3, Fig. 7).

Percorridas as fazes precedentes, o fuzo que até aqui conservou pequenas dimensões, se alonga bastante, estreitando-se proporcionalmente; as extremidades continuam a ser ocupadas pelas placas ou cones de cromozomios do cariozoma entre as quais se estendem paralelamente, numerosos filamentos acromaticos onde aparecem, então, distribuidos os cromozomios perifericos que formavam a placa equatorial das fazes precedentemente descritas. Neste periodo os centriolos aparecem bem viziveis colocados nas placas polares e continuam ligados um ao outro pelo filamento de união, apenas mais alongados que nas fazes precedentes (Est. 3, Fig. 8).

Em seguida começam os cromozomios perifericos a se dirijir para os pólos do fuzo, junto aos quais, em opposição á placa cariozomica, formam, de cada lado, pequeno agrupamento conico e apenas separado della por pequena zona clara, atravessada por filamentos acromaticos.

Com esta orientação diverjente dos cromozomios perifericos coincide o estreitamento, na parte central do fuzo da fase precedente cujos extremos, afinal, só ficam ligados pelo filamento de união dos centriolos (Est. 3, Fig. 9).

Ao mesmo tempo que se dá o alongamento do fuzo nas fazes precedentes, observam-se os primeiros sinais de tendencia do protoplasma á segmentação e que se manifestam pelo alargamento transversal do flajelado, não tardando a aparecer um pequeno entalhe na porção posterior delle (Est. 3, Fig. 10).

Eine spätere Phase des Prozesses bildet die Teilung des Chromosomenbandes der eben beschriebenen Phase, welche in der Mitte und senkrecht auf seine Axe erfolgt, und das Abrücken der beiden Teile, welche sich nach den Polen der Spindel begeben; sie zeigen dabei die Form zweier kleiner Kegel, welche durch eine dunklere Faser getrennt sind, die der Verbindungsfaser der Centriolen entspricht. An der peripheren Chromosomenplatte ersieht man keine Veränderung (Tafel 3, Fig. 6). Schon in dieser Teilungsphase verlieren die an den Polen der Spindel gelegenen Kegel, die von Caryosomen abstammen, manchmal ihre Form und bieten dann das Bild kleiner Polplatten; gewöhnlich findet aber diese Veränderung erst später statt (Tafel 3, Fig. 7). Nach Vollendung der vorhergehenden Phasen streckt sich die bis dahin kleine Spindel beträchtlich und verschmälert sich dementsprechend; ihre Enden werden noch immer durch die Platten oder Kegel der Chromosomen des Caryosoms eingenommen, zwischen welchen zahlreiche parallele achromatische Fäden verlaufen, auf welchen die peripherischen Chromosomen, welche die eben beschriebene Aequatorialplatte bildeten, verteilt erscheinen. In diesem Augenblick erscheinen die Centriolen deutlich an den Polarplatten lokalisiert und noch immer verbunden durch die Faser, welche nur etwas verdünnt erscheint (Tafel 3, Fig. 8).

Im weiteren Verlaufe begeben sich die peripherischen Chromosomen nach den Polen der Spindel und bilden in der Nähe derselben, der Chromosomplatte entgegengesetzt, auf beiden Seiten eine kleine kegelförmige Gruppe, welche von denselben nur durch eine kleine, von achromatischen Fasern durchsetzte Zone getrennt ist. Mit dieser divergierenden Anordnung der peripheren Chromosomen coincidirt eine centrale Einschnürung der Spindel der vorigen Phase, so dass ihre Enden zuletzt nur durch die Verbindungsfaser der Centriolen vereinigt erscheinen (Tafel 3, Fig. 9).

Gleichzeitig mit der Streckung der

Adiantando-se o processo de divizão, rompe-se o filamento de união dos centriolos e, de cada lado do protozoario, aparecem, então, izoladas as duas porções resultantes da divizão sucessiva dos elementos do cariozoma e da cromatina periférica, tendo cada uma o seu centriolo e possuindo metade do filamento de união. E' cada vez mais acentuada a divizão do filamento do protoplasma (Est. 3, Fig. 11).

Começam então, daqui por deante, em cada um dos duplos grupos de cariozomas originais do nucleo primitivo, os fenomenos de reconstituição nuclear dos dois futuros flajelados, provenientes da divizão do protozoario primitivo. Observa-se, então, que, aos poucos, do cone de cromozomios perifericos se vão desprendendo bastonetes que passam para a pequena zona de separação dos dois grupos de cromozomios (perifericos e cariozomicos) e aí se dispõem sob a fórmula de pequena corôa em torno dos elementos de natureza cariozomica. Geralmente nesta fase a divizão protoplasmica já é muito acentuada não restando, afinal senão uma pequena ponte ligando os dois flajelados (Est. 3, Fig. 12 e 13).

Em todo o periodo de divizão até aqui, o flajelado não apresenta a menor diminuição de mobilidade; é na mais constante movimentação que o processo evolve até o seu termo, notando-se mesmo, nas ultimas fases, o esforço com que os novos flajelados procuram libertar-se um do outro, por meio de movimentos subitos e muito ativos até que, finalmente, conseguem romper os ultimos liames e ficam livres. Os flajelados recentemente divididos apresentam, tambem, movimentos muito vivos graças aos dois flajelos com que cada um delles fica munido (Est. 3, Fig. 14).

Uma vez separadas as celulas, nellas se acentúa a reconstituição nuclear. A porção proveniente do cariozoma do nucleo primitivo e que dará origem a novo cariozoma aumenta vizivelmente de volume, vai-se tornando arredondada e compacta ao mesmo tempo que os cromozomios perifericos co-

Spindel während der vorhergehenden Phasen, beobachtet man die ersten Anzeichen einer Teilungstendenz am Protoplasma, welche sich durch eine queere Verbreiterung des Flagellaten äussern, wobei bald ein kleiner Einschnitt an den hinteren Portionen desselben auftritt (Tafel 3, Fig. 10).

Beim Fortschreiten des Teilungsprozesses zerreißt die Verbindungsfaser der Centriolen und auf jeder Seite des Protozoen erscheinen nun getrennt die beiden Teile, welche aus der successiven Teilung der Elemente des Caryosoms und des peripheren Chromatins hervorgehen, indem jeder sein Centriol und die Hälfte der Verbindungsfaser aufweist; dabei akzentuiert sich die Teilung des Protoplasmas immer mehr (Tafel 3, Fig. 10—13). In den beiden Gruppen der Chromosomen, welche aus dem ursprünglichen Kern hervorgehen, beginnen nun die Erscheinungen der Kernrestitution der beiden, von den ursprünglichen Organismus abstammenden, zukünftigen Tiere. Man sieht dann wie allmählig vom Kegel der peripheren Chromosomen sich Stäbchen ablösen und in die schmale Trennungszone der beiden Gruppen von Chromosomen (des Caryosoms und der Peripherie) übertreten und sich dort in Form eines kleinen Kranzes um die Elemente, die vom Caryosom abstammen, anordnen. Gewöhnlich ist in dieser Phase die Teilung des Protoplasmas schon sehr ausgesprochen und nur eine kleine Verbindungsbrücke zwischen den beiden Flagellaten erkennbar (Tafel 3, Fig. 12 u. 13).

Während der ganzen Teilung bis zu dieser Phase, zeigt die *Polytomella* keine Verminderung der Beweglichkeit; der Prozess verläuft bis zum Ende während ununterbrochener Bewegungen und man bemerkt sogar zum Schlusse die Anstrengungen, welche die neue gebildeten Individuen machen, um sich durch rasche und kräftige Bewegungen von einander zu trennen, bis es ihnen schliesslich gelingt, die letzten Verbindungen zu zerreißen und frei zu werden. Nach der Teilung zeigen sie gleichfalls sehr leblafte Bewegungen mit

meçam, aos poucos, a cercal-o, ao passo que, o cone, primitivamente por elles formados diminue vizivelmente de tamanho com a saída dos elementos que o constituíam (Est. 3, Fig. 15).

Não tarda que esse cone desapareça por completo e os elementos que o constituíam, apareçam então dispostos regularmente na periferia do novo nucleo junto a nova membrana que então se forma para limitar o nucleo. A esse tempo o cariozoma se torna completamente redondo e o nucleo em nada difere do tipo normal; sómente se acha colocado excentricamente no flajelado (Est. 3, Fig. 16). Não tarda, ainda que elle venha tomar a sua posição normal no centro da celula e que deste modo terminem os fenomenos nucleares do processo de divizão.

Sucede, agora, a multiplicação dos flajelos que se parece dar pela divizão direta dos dois corpusculos bazais do protozoario, ficando um com um flajelo e dando o outro origem a um elemento semelhante. Desta fórma, em breve, tem o protozoario adquirido o numero normal de organs locomotores e, assim, com a reconstituição do nucleo e rejeneração dos flajelos termina o processo de divizão do flajelado.

COPULAÇÃO.

A copulação dos flajelados não é fenomeno muito comumente observado, em muitas fórmas; naquellas mesmas em que em maior abundancia proliferam nas culturas é ella desconhecida.

A *Polytomella agilis*, não fazendo excepção á regra, só muito raramente entra em copulação. O fenomeno só é observado nas culturas já antigas e muito abundantes; ainda nestas, o numero de fórmas que entra em copulação nunca é muito grande o que dificulta sobremodo a pesquisa dos diferentes estádios nos preparados fixados nos quais sómente é possivel observar as particularidades ultimas do processo sexual. Os elementos que entram em copulação não apresentam diferenças sexuais perceptíveis

Hülfe der beiden Geisseln, welche jedem von ihnen verbleiben (Tafel 3, Fig. 14).

Nach Trennung der Zellen zeigt sich die Rekonstitution des Kernes immer mehr. Der Anteil, welcher von dem Caryosom des primitiven Kernes abstammt und den Ursprung des neuen Caryosoms bildet, wächst sichtlich an Umfang, rundet sich ab und verdichtet sich, während die peripheren Chromosomen ihn allmählig umgeben und der ursprünglich von ihnen gebildete Kegel durch Auswanderung seine Bestandteile sichtlich abnimmt (Tafel 3, Fig. 15).

Bald verschwindet er vollständig und seine Bestandteile erscheinen dann regelmäßig geordnet an der Peripherie des neuen Kernes und im Innern der neuen begrenzenden Membran. Jetzt ist auch das Caryosom vollständig rund geworden und der Kern weicht vom normalen Typus nur dadurch ab, dass er excentrisch liegt (Tafel 3, Fig. 16). Doch nimmt er bald darauf seine normale Stellung im Centrum der Zelle ein, womit die sich am Kerne abspielenden Erscheinungen des Teilungsprozesses vollendet sind.

Es findet hierauf die Vermehrung der Geisseln statt, anscheinend durch direkte Teilung der beiden Basalkörperchen, wobei das eine die Geisseln behält und das andere eine neue erzeugt, sodass bald darauf der Organismus die Normalzahl von Bewegungsorganen erhält und dergestalt mit Rekonstitution des Kernes und Regeneration der Geisseln der Teilungsprozess zum Abschluss kömmt.

KOPULATION.

Die Kopulation der Flagellaten ist keine häufige Erscheinung und ist bei vielen Formen — auch solchen, die sich in den Kulturen sehr stark vermehren — nicht bekannt. Auch hier bildet die *Polytomella agilis* keine Ausnahme, indem sie nur selten eine Kopulation eingeht. Die Erscheinung wird nur bei alten und sehr reichlichen Kulturen beobachtet und selbst dann ist die Zahl der kopulierenden Paare nie sehr

entre si, são porém, em geral, menores que as demais fórmulas das culturas. E' provavel, até certo ponto, que esta diferença de tamanho, corresponda a um estado de depressão da célula, o que muito déve auxiliar as manifestações sexuais do protozoario.

A parte grosseira do fenomeno póde ser facilmente acompanhada ao microscopio ; quanto, porém, ás alterações nucleares de que ella se segue, só em preparações fixadas e córadas podem ser observadas em seus intimos pormenores.

Estudada em gota pendente a copulação apresenta as seguintes fazes : A principio, observa-se que certo numero de flajelados da mesma cultura como a se procurarem com certa insistencia ; tocam-se e afastam-se a cada momento uns dos outros, até que, depois de por algum tempo repetirem esse manejo, dois delles se encontrando nas condições necessarias á realização da copulação se fixam um ao outro, pelas porções laterais anteriores, tomando o aspéto de uma fórmula de divizão em periodo adiantado, quando os flajelados já procuram separar-se um do outro. Ao contrario, porém, do que acontece na divizão, aqui o que se observa é cada vez mais intima e igual fuzão dos protozoarios ; rapidamente a figura de copulação toma a fórmula de elipse larga e curta, em cujo eixo maior, ao começo, ainda se observam vestijios da separação entre os flajelados, que não tardam a desaparecer. Fundindo-se afinal por completo os gametas, o zigoto apresenta-se com a fórmula esférica.

Durante as fazes da copulação anteriormente referidas, pouco a pouco vai diminuindo a mobilidade até desaparecer por completo, algum tempo apoz a constituição do zigoto, quando desaparecem os flajelos, tornando-se a célula imovel.

Depois que os flajelados, por completo, se têm fundido, observa-se o aparecimento em torno ao zigoto de uma delgada membrana que aos poucos se espessa, ocorrendo então o encistamento delle. A parte do ato sexual, acima descrita, é aquella que a

gross, wodurch die Erforschung der verschiedenen Stadien an fixierten Präparaten (bei welchen allein die feineren Einzelheiten erkannt werden können) sich ausserordentlich erschwert. Die kopulierenden Individuen zeigen keine Geschlechtsunterschiede, sind jedoch im Allgemeinen kleiner als die übrigen Kulturformen. Es ist bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich, dass ein solcher Grössenunterschied einem Depressionszustande der Zelle entspricht, welcher zum Auftreten der Geschlechtserscheinungen bei den Protozoen besonders beitragen soll.

Die gröberen Erscheinungen können leicht unter dem Mikroskope verfolgt werden ; dagegen lassen sich die Veränderungen an den Kernen in ihren feinsten Einzelheiten nur an fixierten und gefärbten Präparaten erkennen.

Im hängenden Tropfen studiert, beobachtet man, dass in derselben Kultur eine Anzahl Flagellaten sich mit einer gewissen Beständigkeit aufzusuchen scheinen ; sie berühren sich jeden Augenblick und trennen sich wieder, bis, nach öfterer Wiederholung dieses Spieles, zwei derselben die notwendigen Bedingungen zur Realisierung der Kopulation erreichen und sich mit einander durch die seitlichen Partien der Vorderenden vereinigen und so das Bild einer vorgeschrittenen Teilungsform bieten, wenn die Flagellaten von einander loszukommen suchen. Im Gegensatz dazu beobachtet man jedoch eine immer innigere und gleichmässigere Verschmelzung der Protozoen ; bald nimmt das Paar eine kurze und dicke Eiform an, in deren Längsaxe anfangs noch Spuren der Trennung erkennbar sind, welche aber auch baldigst verschwinden ; indem so endlich die Gameten vollständig verschmelzen, zeigt der Zygote eine kugelige Form.

Während der soeben beschriebenen Kopulationsphasen nimmt die Beweglichkeit der Individuen allmählig ab und hört schliesslich einige Zeit nach Bildung der Zygoten, vollständig auf, indem die Geisseln verschwinden, wodurch die Zelle unbeweglich wird.

observação permite verificar nas preparações a fresco. As fazes nucleares do fenómeno, essas só em material fixado e córado podem ser pesquisadas em seus delicados pormenores.

Aqui também a *Polytomella agilis*, não fazendo exceção aos demais flajelados quando entram em copulação, apresenta como fenómenos nucleares mais característicos reduções que precedem a fusão dos nucleos.

Tanto quanto a nossa observação permite afirmar, a redução nuclear parece efetuar-se por um mecanismo de divisão heteropolar, com a formação de fuço com desigual distribuição de cromozomios de modo bastante semelhante ao que DOBELL (Quart. Journ. of Micr. Sc. Vol. 52, pag. 1) descreve na *Copromonas subtilis*.

A redução começa, ora em fazes muito adiantadas da copulação, ora nos periodos iniciais da fusão celular e também não ocorre ao mesmo tempo, em ambos os nucleos.

Tambem na *Polytomella agilis* como succede no *Copromonas subtilis* só conseguimos observar e emissão de um corpusculo de redução que aparece ligado por um filamento acromatico ao resto do nucleo, porém que não tarda a se separar d'elle e a desaparecer no protoplasma da célula. Os nucleos reduzidos se aproximam, então, um do outro e não demoram a se fundir um com o outro intimamente, terminando-se assim as fazes nucleares da copulação de que as Fig. 17—20 da Est. 3 exemplificam algumas das fazes.

ENCISTAMENTO.

O aparecimento de cistos nas culturas da *Polytomella* é muito precoce. Começam a ser vistos desde os primeiros dias de cultura, quando ainda os flajelados proliferam abundantemente, e nas melhores condições de nutrição do meio, não são, portanto, devidos a condições desvantajozas deste, mas, antes, á necessidade e um pe-

Nach vollständiger Verschmelzung der Paare, bemerkt man um die Zygoten eine dünne Membran, die sich allmählich verdickt und zur Incystierung führt. Meine Beschreibung entspricht demjenigen Antheile des Sexualaktes, der sich an frischen Präparaten verfolgen lässt. Die Erscheinungen an den Kernen können in ihren feineren Einzelheiten nur an fixiertem und gefärbtem Materiale studiert werden. Hier zeigt die *Polytomella agilis*, ebenfalls in Ueberstimmung mit der Kopulation anderer Flagellaten, als besonders charakterische Erscheinung eine Kernreduktion als Vorläufer der Kernverschmelzung.

Soweit ich aus meinen Beobachtungen schliessen darf, erfolgt die Kernreduktion durch heteropolaren Teilungsmechanismus, unter Bildung einer Spindel mit ungleicher Chromosomenverteilung, ähnlich wie sie DOBELL bei der *Copromonas subtilis* beschrieb (DOBELL, Quart. Journ. of Mikrosk. Sc., vol. 25, pag. 1).

Die Reduktion beginnt bald in sehr vorgeschrittenen Phasen der Kopulation, bald in den Anfangsperioden der Zellfusion und findet auch in den beiden Kernen nicht gleichzeitig statt.

Wie es bei der *Copromonas subtilis* der Fall war, so konnte ich auch bei der *Polytomella agilis* nur die Ausstossung eines Reduktionskörperchens beobachten, welches durch eine achromatische Faser mit dem Reste des Kernes verbunden erscheint, sich jedoch bald von demselben trennt und im Protoplasma der Zelle verschwindet.

Es nähern sich dann die reducierten Kerne, um bald vollständig zu verschmelzen; dies bildet den Abschluss der Kernerscheinungen bei der Kopulation, von welchem die Fig. 17-20 der Tafel 3 einige Beispiele geben.

INZYSTIERUNG.

Die Erscheinung von Zysten in den Kulturen der *Polytomella* ist eine sehr frühzeitige; sie fangen schon in den ersten Tagen an aufzutreten, wenn die Flagellaten sich in den Kulturen noch reichlich

riodo de repouzo apoz uma faze das mais favoraveis condições vitais.

Os flajelados com tendencia ao encistamento se caracterizam pelo aumento progressivo dos microgranulos do protoplasma que, aos poucos, vão enchendo todo o corpo do flajelado e encobrendo quazi o nucleo. Nota-se, então, nestas fórmulas grande tendencia aos movimentos tigmotropicos anteriormente descritos. (Est. 3, Fig. 21). Aos poucos, o flajelado vai perdendo a fórmula ovoidal e tornando-se eliptico; os flajelados desprendem-se uns apoz outros, encontrando-se facilmente fórmulas com 1, 2 ou 3 desses organs. Começa, já, então a observarem-se vestijios de delgada membrana cercando a celula. (Est. 3, Fig. 22). Em periodo mais adiantado desaparecem por completo os flajelos, o flajelado toma uma fórmula quazi regularmente esférica, o nucleo então quazi desaparece sob a quantidade de microgranulos agóra acumulados uns juntos aos outros. A membrana torna-se mais nitida em volta da celula.

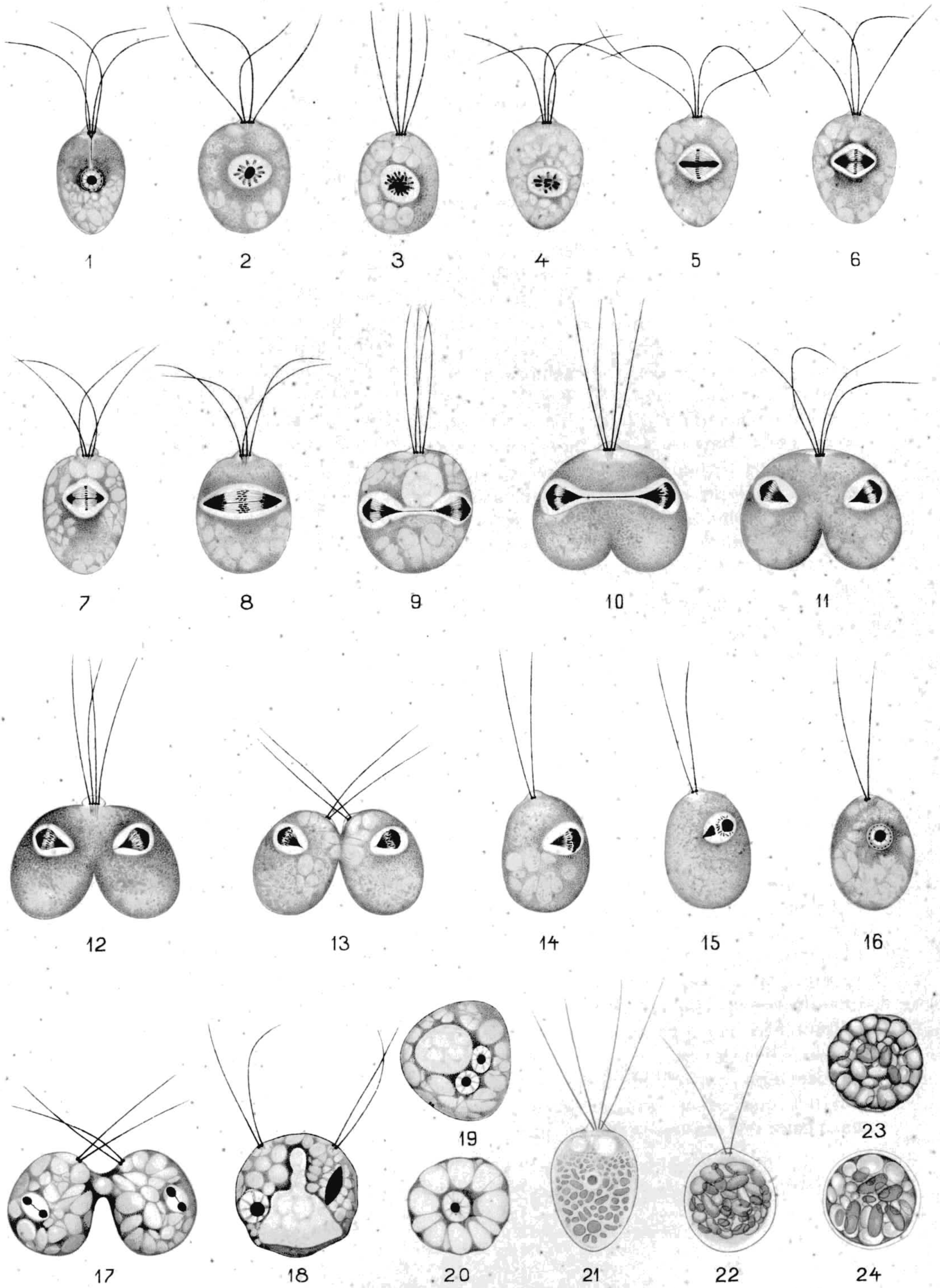
Não tarda o cisto a ficar completamente constituido; apresenta, então, uma fórmula muito regularmente circular e é cercado por uma membrana muito nitida de duplo contorno e seu interior é ocupado pelo nucleo do protozoario difficilmente perceptivel sob os microgranulos dispostos uns ao lado dos outros. O cisto méde, então, 8 μ de diametro, em média, e tem um colorido amarelo claro. (Est. 3, Fig. 23: cisto apoz fixação) e 24 (cisto visto a fresco).

Sobre a evoluçáo do protozoario neste cisto nada podemos dizer por emquanto, apesar das tentativas para observá-lo, nenhum sucesso lográmos alcançar. E' certo, porém, que grande numero destes cistos quando transportados para novo meio de cultura não dão lugar á saída de novo flajelado, elles dejeneram os microgranulos se fundem uns com os outros em massas irregulares que saem do cisto com a ruptura da membrana em um ponto qualquer.

Os microgranulos que fóra do cisto tão facilmente se córam, uma vez cercados

vermehrten und diese noch die besten Ernährungsbedingungen bieten. Sie sind also nicht eine Folge ungünstiger Bedingungen, sondern eher der Notwendigkeit einer Ruheperiode nach einer Phase günstiger Lebensbedingungen.

Die Tendenz zur Inzystierung kennzeichnet sich bei den Flagellaten durch allmähliche Zunahme der Mikrogranula im Protoplasma, welche allmählich den ganzen Zelleib erfüllen und den Kern fast verdecken. Man bemerkt alsdann an diesen Formen eine grosse Tendenz zu tigmotropischen Bewegungen, wie sie oben beschrieben wurden (Tafel 3, Fig. 21). Nach und nach verliert der Flagellat seine Eiform und wird länglich. Die Geisseln lösen sich successive ab, so dass man leicht Formen mit einer, zwei oder drei derselben findet. Es beginnt alsdann das Auftreten einer Andeutung einer dünnen Membran um die Zelle (Tafel 3, Fig. 22). In einem vorgerückteren Stadium sind die Geisseln völlig verschwunden und die Form ist fast regelmässig kugelig, während der Kern unter den angehäuften kleinen Körnern fast verschwindet. Die die Zelle umgebende Membran erscheint immer deutlicher. Bald wird die Zyste vollständig ausgebildet und zeigt alsdann eine regelmässig runde Form, von einer sehr deutlichen, doppelkonturirten Membran umgeben, während das Innere von dem Kerne eingenommen wird, der unter den aneinander gelagerten Mikrogranulis schwer erkennbar ist. Die Zyste misst dann 8 μ in mittlerem Durchmesser und zeigt eine hellgelbe Färbung. Ueber die Entwicklung des Protozoen in dieser Zyste kann ich nichts aussagen, da meine Versuche, sie zu beobachten, kein Resultat gaben; es ist jedoch sicher, dass eine grosse Zahl dieser Zysten bei Uebertragung in neue Nährlösungen keine Flagellaten austreten lassen; sie degenerieren und die Mikrogranula verschmelzen gegenseitig zu unregelmässigen Massen, welche durch Ruptur der Membran an einer beliebigen Stelle aus der Zyste austreten. Die Mikrogranula, welche sich ausserhalb der Zysten leicht färben lassen, widerstehen, nach-



da membrana completamente constituída, rezistem á influencia do iodo, do *Neutralrot*, do azul de metilénio etc. Tem-se mesmo completa certeza de que um cisto está definitivamente constituído pela rezistencia que oferece á penetração de tais substancias.

A membrana do cisto é extraordinariamente rezistente aos agentes físicos e químicos. Não têm a menor influencia sobre ella, modificando-a ou dissolvendo-a, o aquecimento, o alcool, o éter, o clorofórmio, o xilol, os ácidos clorídrico, acético e azótico, mesmo em forte concentração e o reativo de SCHWEITZER.

Os cistos provenientes da copulação distinguem-se dos precedentes, principalmente pelo menor numero de microgranulos nelles existentes. Quanto á sua evolução ulterior nada podemos dizer por enquanto; nunca tivemos occasião de observá-la.

DEJENERAÇÃO.

Nas culturas antigas do protozoario não raro se observa o aparecimento de fórmulas de dejeneração atinjindo, tanto o protoplasma, como o nucleo. Uma dessas alterações mais frequentemente observada é o aparecimento de flajelados, apresentando grande vacuolo não pulsátil, tomando todo o espaço entre o nucleo e a orijem dos flajelos. Outro indicio de degradação celular é o aparecimento de fórmulas alongadas terminadas em ponta aguda e, nas quais, não raro, se manifestam divizões protoplasmicas desiguais e que geralmente são difíceis de fixar e que também se córam irregularmente.

Tanto em uma, como em outra, destas fórmulas de dejeneração se encontra muito comumente o nucleo fragmentado em dois pedaços colocados um ao lado do outro, ou um pouco separados, simulando uma fórmula de conjugação, em periodo de fuzão nuclear.

dem sie von einer vollständig ausgebildeten Membran umschlossen sind, dem Einfluss von Jod, Neutralrot, Metylenblau etc; man kann sogar aus der Resistenz, welche sich dem Eindringen dieser Substanzen bietet, die absolute Sicherheit der vollständigen Ausbildung der Zysten erhalten.

Die Zystenmembran ist gegen physikalische und chemische Agentien ausserordentlich resistant; Erhitzung, Alkohol, Aether, Chloroform, Xylol, Salz-, Essig- und Salpetersäure, selbst in starker Konzentration, und auch das Reagens von SCHWEIZER haben nicht den geringsten Einfluss auf dieselbe, weder im Sinne einer Veränderung, noch in demjenigen einer Auflösung.

Die Zysten, welche nach der Kopulation auftreten, unterscheiden sich von den anderen durch die kleinere Anzahl der darin enthaltenen Mikrogranula. Ueber ihre weitere Entwicklung kann ich nichts aussagen, da ich niemals Gelegenheit hatte, eine solche zu beobachten.

DEGENERATION.

In allen Kulturen der Protozoen beobachtet man nicht selten das Auftreten von Degenerationsformen, welche sowohl das Protoplasma, wie den Kern betreffen. Eine der häufigsten Veränderungen besteht im Auftreten von Flagellaten, welche eine grosse, nicht pulsierende Vakuole zeigen, die den ganzen Raum zwischen Kern und Ursprungstelle der Geisseln ausfüllt. Ein anderes Anzeichen der Zelldegeneration liegt im Vorkommen von verbreiterten Formen, die mit einer scharfen Spitze endigen und in welchen sich nicht selten ungleiche Protoplasmateilungen zeigen, die sich gewöhnlich schwer fixieren lassen und sich auch unregelmässig färben. Sowohl bei der einen, wie bei der anderen Degenerationsform findet man sehr häufig den Kern in zwei Fragmente zerfallen, welche neben einander oder etwas getrennt liegen und eine Konjugationsform in der Periode der Kernverschmelzung vortäuschen.

