

Prace Instytutu
im. Nenckiego
Travaux de l'Institut Nencki.

Vol. VI.



Z zasiłku Wydziału Nauki
Ministerstwa Wyznań Religijnych i Oświecenia Publicznego

WARSZAWA
INSTYTUT IM. NENCKIEGO T. N. W., ŚNIADECKICH 8.

1930

Acta Biologiae Experimentalis

Czasopismo, ogłaszające rozprawy naukowe z zakresu fizjologii i chemii fizjologicznej roślin i zwierząt, morfologii doświadczalnej, zoopsychologii oraz dziedzin pokrewnych. Ponadto — dział p. t.: „Bibliographia Polonica”.

Wydawactwo to ukazuje się w liczbie około dwu tomów rocznie

Tom IV, 1930, zawiera następujące rozprawy:

M. LASKOWSKI (Warszawa): O pobieraniu tlenu przez skórę u żaby. — Z. KOEHLER † (Kraków): Rozpuszczalność związków fosforowych zarodków żyta. — J. DMOCHOWSKI (Warszawa): O purynach mięśni. — M. CHEJFEC (Warszawa): Długość życia *Paramecium caudatum* w związku z odżywianiem. — BR. ZAWADZKI (Warszawa): Badania nad rozmieszczeniem niektórych kryształoidów w układach koloidalnych, zbliżonych do cytoplazmy. — Z. CZERNIEWSKI (Warszawa): *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Studja biologiczne Cz. I. — D. ASSENHAJM (Warszawa): O ilościowym oznaczaniu puryn w kwasie nukleinowym drożdżowym metodą Steudela. — O. KRAUZE (Warszawa). Przyczynek do poznania zachowania się cządzownicy. — T. CYGOWA (Warszawa): Studja anatomiczno-ekologiczne nad liśćmi storczyków krajowych. — J. M. ZDUNKIEWICZ (Warszawa): O rozkładzie puryn w różnych warunkach autolizy. — E. EISENBERG-HAMBURG (Warszawa): Wpływ soli strontu na poruszanie się wymocзка *Paramecium caudatum*. — J. V. SUPNIEWSKI (Kraków): Nowy przyrząd do określania gazowej przemiany materji małych zwierząt. — L. MAZURKIEWICZ and H. BUKOWIECKI (Warszawa): Photomicrography in the dark. — BIBLIOGRAPHIA POLONICA.

Cena pojedynczego tomu (około 20 arkuszy): w prenumeracie—20 zł. oddzielnie—25 zł. Współpracownicy czasopisma otrzymują 10% ustępstwa

Zgłoszenie do prenumeraty przyjmuje:

Administracja Instytutu im. Nenckiego
(Warszawa, ul. Śniadeckich 8, tel. 536-31).

Skład główny:

„Ekspedycja Kasy im. J. Mianowskiego”
(Warszawa, Nowy-Świat 72, Pałac Staszica).

Prace Instytutu im. Nenckiego

Travaux de l'Institut Nencki.

Vol. VI.



Z zasiłku Wydziału Nauki
Ministerstwa Wyznań Religijnych i Oświecenia Publicznego

WARSZAWA
INSTYTUT IM. NENCKIEGO T. N. W., ŚNIADECKICH 8.

1930

Prace Instytutu

im. Nenckiego

Travaux de l'Institut Nencki

Vol. VI



Ministerstwo Wychowania i Opieki Społecznej
Warszawa

WARSZAWA

Instytut Nencki im. J. Nenckiego

TREŚĆ TOMU SZÓSTEGO.

- J. Neyman.** *Contribution to the theory of certain test criteria.* XVIII-e Session de l'Institut International de Statistique. Varsovie, 1929 (1—46).
- M. Laskowski.** O pobieraniu tlenu przez skórę u żaby. *Über die Sauerstoffaufnahme durch die Haut beim Frosche.* Acta Biol. Exper. 4, № 1, 1929 (1—32).
- M. Chejfec.** Długość życia *Paramecium caudatum* w związku z odżywianiem. *Labensdauer von Paramecium caudatum in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge.* Acta Biol. Exper. 4, № 4. 1929 (73—118).
- J. Neyman.** *Sur la limite de la vraisemblance de l'hypothèse.* Comptes Rend. de l'Acad. des Sc. 1929 (1—3).
- J. Neyman.** *Sur une méthode de verification des hypothèses.* Comptes Rend. de l'Acad. des Sc. 1929 (5—7).
- Br. Zawadzki.** Badania nad rozmieszczeniem niektórych krystaloidów w układach koloidalnych, zbliżonych do cytoplazmy. *Researches on the distribution of certain crystalloids in colloidal systems semilar to cytoplasm.* Acta Biol. Exper. 4, № 5, 1929 (119—149).
- Z. Czerniewski.** *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Studja biologiczne. Cz. I. *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. *Biologische Studien I.* Acta Biol. Exper., 4, № 6, 1929 (151—166).
- O. Krauze.** Przyczynek do poznania zachowania się dżdżownicy. *Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens des Regenwürmes.* Acta Biol. Exper. 4, № 8, 1929 (175—205).
- M. Bogucki.** *Recherches sur la perméabilité des membranes et sur la pression osmotique des oeufs des Salmonides.* „Protoplasma“, 9, № 3, 1930 (345—369).
- M. Bogucki.** O rzekomo hamującym wpływie cieczy celomatycznej jeżowców na powstawanie błony zapłodnienia i na bródkowanie. *A propos de la prétendue action inhibitrice du liquide oelomique d'Oursin sur la membranogénèse et la segmentation.* Acta Biol. Exper., 5, № 4, 1930 (47—55).

- J. Neyman.** *Méthodes nouvelles de vérification des hypothèses.* Compte Rend. du I Congrès des Mathématiciens des Pays Slaves. Varsovie, 1930, (355—366).
- K. Białaszewicz.** *Badania nad zjawiskami regulowania składu mineralnego cieczy ciała. I. Doświadczenia nad krabem Maja squinado. Recherches sur la régulation de la composition minérale dans les liquides organiques. I. Expériences exécutées sur le Crabe, Maja squinado.* Acta Biol. Exper. 5, № 5, 1930 (57—85).
- E. S. Pearson and J. Neyman.** *On the problem of two samples.* Bull. de l'Acad. Polonaise des Sc. et des Lettres. Série A: Sciences Mathématiques, 1930 (73—96).
- S. Kołodziejczyk.** *Über die Glaubwürdigkeit gewisser Hypothesen.* Compt. Rend. du I Congrès des Mathématiciens des Pays Slaves. Varsovie, 1930 (370—374).
- S. Dembowska.** *Studien über die Regeneration von Stylonychia mytilus.* Arch. f. mikr. Anat. u. Entw.-Mech., 104, 1925 (185—209).
-

XVIII^e SESSION DE L'INSTITUT
INTERNATIONAL DE STATISTIQUE

VARSOVIE, 1929

Contribution to the Theory of Certain
Test Criteria

J. NEYMAN

WARSZAWA — VARSOVIE

1929

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY
130 St. George Street, Toronto, Ontario M5S 1A5

1971 JUN 14

CONSERVATION OF THE
LIBRARY

1971

CONTRIBUTION TO THE THEORY OF CERTAIN TEST CRITERIA

By J. Neyman, Ph. D.

(Biometric Laboratory, Nencki Institute, Warsaw).

CONTENTS

	Page
I. Introductory	4
II. The Use of Probabilities a Posteriori:	
1) General Remarks	5
2) Fundamental Theorem	6
3) Lemma	8
4) Integral Z and Theorem II	16
5) Proof of the Fundamental Theorem	20
6) Theorem III	21
III. The Testing of Composite Hypotheses:	
7) Linear Case, Theorem IV	25
8) Non-linear Case, Theorem V	30
9) Control of Errors Kind 1	32
IV. The Applications of Previous Results:	
10) Composite Hypothesis Concerning the Mean and the Variance	38
11) Composite Hypothesis Concerning Two Means	40
12) Composite Hypothesis Concerning the Coefficient of Correlation	43
13) Composite Hypothesis Concerning the Coefficient of Regression	45
Summary of Results (in French)	47

I. INTRODUCTORY

There has been recently published a general principle of testing hypotheses¹.

The errors in testing hypotheses can be of one of two kinds: 1) we may sometimes reject a true hypothesis and 2) we may accept a false one. Therefore suitable methods of testing hypotheses must control both sources of errors. This can be done 1) in calculating the likelihood, λ , of the hypothesis under consideration, which, if very small, seems to indicate that the hypothesis is false and 2) estimating the probability, P , that in rejecting the hypothesis having the likelihood $\leq \lambda$, we shall reject a true one.

It has been shown that in very frequent cases the probability P can be estimated by an integral, I , originally introduced by K. Pearson and R. A. Fisher². In all these mentioned papers the introduction of the integral I and the proof that it may be used as an estimate of the probability P are quite independent of any appeal to the theory of probabilities *a posteriori*.

It is interesting to show that starting from a different point of view, namely that of inverse probabilities, we get as the estimate of the same probability P an integral, say J , which is the limit of I when the size of the sample indefinitely increases.

This is the purpose of the present paper. It contains further certain theorems concerning the limit of the likelihood, which allow to test a large class of hypotheses. It ends with some examples of testing composite hypotheses, which seem to be novel.

¹ J. Neyman and E. S. Pearson: „On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference“. *Biometrika* Vol. XX-A

² K. Pearson, *Phil. Mag.* July 1900.

³ R. A. Fisher, *Journ. Roy. Stat. Soc.* LXXXV and LXXXVII.

We shall start with some general considerations concerning the probabilities *a posteriori* and shall give a new proof of a remarkable theorem which I call the Fundamental Theorem, and which is included in a paper published by v. Mises in *Mathematische Zeitschrift* 1919¹.

II. THE USE OF PROBABILITIES A POSTERIORI

1. General Remarks.

Suppose we are interested in some constants, x, y, \dots, z , specifying the sampled population and that we know the *a posteriori* probability law of these constants, say

$$f(\Sigma, x, y, \dots, z) \tag{1}$$

where Σ denotes the observed random sample. The meaning of the function $f(\Sigma, x, y, \dots, z)$ as I understand it, is the following. Consider the universe of populations and samples of them which we shall meet in practice and call this universe Ω . Denote further by $\Omega_{(\Sigma)}$ the subuniverse of cases in which the sample is identical with a certain specified Σ . The value of the function f will be equal to the proportion of the subuniverse $\Omega_{(\Sigma)}$ in which the sampled population will have the ascribed values of the constants x, y, \dots, z . As usual we shall represent the sampled population by points in the multidimensional space with coordinates x, y, \dots, z . If the sample Σ is given, we can associate with every such point the value of the likelihood, λ , of the hypothesis that the sampled population had its constants equal to the coordinates of the considered point. Fix a certain value of the likelihood, say $\lambda = \lambda_0$ and consider the region Q in our population space in which $\lambda \leq \lambda_0$. Our method of controlling the errors of kind 2) consists in rejecting hypotheses with small likelihoods, thus corresponding to points inside a certain region Q . To control the errors of kind 1) we have now to estimate the probability that doing so we shall reject a true hypothesis. Call that

¹ With regard to that theorem I must apologize that I overlooked it for a very long time. Since I proved it independently and was persuaded that it was new, I mentioned it in my paper read before the International Mathematical Congress in Bologna last year without any reference to its original inventor. Unfortunately nobody present noticed that the theorem was not new and its authorship has been wrongly attributed.

Proving the theorem I used a method invented by E. Borel and by S. Bernstein for the proof of a less general theorem.

probability P . Let further p be the probability of dealing with a true hypothesis. This will be the proportion of the subuniverse $\Omega_{(\Sigma)}$ in which the tested hypothesis will be the true one. The probability p is unknown and we shall only take the account of the fact that it is ≤ 1 . Now it is easy to see that

$$P = p \int \dots \int_Q f(\Sigma, x, y, \dots, z) dx dy \dots dz \quad (2)$$

Therefore, to control the errors kind 1) we may calculate the integral of the function $f(\Sigma, x, y, \dots, z)$ over the region Q in the population space, in which the likelihood is less than a certain value λ_0 , the probability of rejecting a true hypothesis being less than this integral.

The difficulty in applying this method consists obviously in the fact that to calculate the *a posteriori* law of probability we must generally have definite informations about the *a priori* probability law. However we shall see below some theorems ascertaining, that in cases when the considered sample is very big¹, the result of calculating the *a posteriori* probability does not very much depend upon the *a priori* law, provided it is known that this last is a continuous function in a certain point of the population space. Certainly such an assumption is an arbitrary one and the main difficulty in applying the inverse probabilities method is thus not removed but is, as it were, reduced to a single point. In fact previous applications of this method were based upon the arbitrary assumption that the *a priori* probability law is constant in the whole space.

2. The Fundamental Theorem.

We shall suppose a sample Σ , of N individuals falling with frequencies

$$n_1, n_2, \dots, n_k; \quad \left(\sum_{i=1}^k n_i = N \right); \quad (n_i > 0) \quad (3)$$

into k groups. This has been drawn at random from some population, Π , in which the corresponding group proportions are

$$p_1, p_2, \dots, p_k; \quad \left(\sum_{i=1}^k p_i = 1 \right) \quad (4)$$

¹ See: K. Pearson, *Biometrika* Vol. XIII pp 1 — 16 and Vol. XVI pp 190—193; E. S. Pearson, *Biometrika* Vol. XVII; pp 388—442.

The p 's, or the form of the population are unknown, but the *a priori* law of probability is

$$\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) \quad (5)$$

Write $\frac{n_i}{N} = q_i$ and suppose that the function ψ is: a) continuous at the point $p_i = q_i$ and, b) that

$$\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) > 0 \quad (6)$$

Let further $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_s$ be any statistical measures based on the p 's of the sampled population Π . We shall assume that the functions θ_i have at any point p_1, p_2, \dots, p_{k-1} single definite values and that they are continuous. Then, if we fix a certain region of values of θ 's, say W , the points of the $k-1$ — dimensional space of p 's for which the values of θ 's are included in the region W , form a certain region, say $\omega(W)$. Let ω denote the whole hyperspace of p 's: $-\infty < p_i < +\infty$ ($i = 1, 2, \dots, k-1$).

We shall now prove the following

Fundamental Theorem: Whatever is the function ψ satisfying the two conditions of being positive and continuous at the sample point q_1, q_2, \dots, q_{k-1} , the probability *a posteriori* $P(W)$, that the functions θ have values appertaining to the region W , differs by less than an arbitrary positive number ε from the ratio

$$I(W) = \frac{\int \dots \int_{\omega(W)} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} dp_1 dp_2 \dots dp_{k-1}}{\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}} \quad (7)$$

provided N is made sufficiently large, the ratios q_i being constant, and where

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \quad (8)$$

The meaning of this theorem is as follows. Suppose that the sample point remains constant, but the size of the sample increases indefinitely. The probability $P(W)$ may change and the ratio $I(W)$ too. It would therefore be inaccurate to say that under the conditions mentioned the probability $P(W)$ tends to the ratio $I(W)$ as that ratio itself is varying. The Fundamental Theorem only affirms that the difference between the probability $P(W)$ and the ratio $I(W)$ tends to zero when $N \rightarrow \infty$.

It is evident that in most cases this circumstance will be suffi-

cient to allow us to consider $I(W)$ as an approximation to the probability $P(W)$. The interesting point is that the ratio $I(W)$ is independent of the *a priori* probability law ψ . For short we shall sometimes call the ratio $I(W)$ the limiting value of $P(W)$.

The proof of the Fundamental Theorem is based upon the following Lemma.

3. The Lemma. Let Ω denote a region in the $k-1$ — dimensional space of p 's satisfying the condition

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \leq \chi_0^2 \quad (9)$$

and Ω' — any region contained in Ω .

Lemma: If the *a priori* probability law satisfies the two conditions a) and b), the probability *a posteriori* $P(\Omega')$, that the population point p_1, p_2, \dots, p_{k-1} lies inside Ω' is asymptotic to the ratio

$$I(\Omega') = \int_{\Omega'} \dots \int e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} / \int_{\omega} \dots \int e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (10)$$

when N indefinitely increases, the ratios q_i remaining constant, and χ_0^2 being any positive number whatever. In other words: if $N \rightarrow \infty$, the ratios q_i remaining constant, the ratio

$$P(\Omega') / I(\Omega') \rightarrow 1 \quad (11)$$

Proof.

The complete expression of the law of *a posteriori* probability of p_1, p_2, \dots, p_{k-1} is

$$\Psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) = \frac{\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k}}{F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})} \quad (12)$$

where

$$F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) = \int \int \dots \int_{\tau} \psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (13)$$

τ being the region in the $(k-1)$ — dimensional space for which

$$0 \leq p_i \leq 1 \quad (i = 1, 2, \dots, k-1) \text{ and } \sum_{i=1}^k p_i = 1 \quad (14)$$

The probability $P(\Omega')$ is therefore

$$P(\Omega') = \iint \dots \int_{\Omega'} \Psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} / F_{\psi}(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \quad (15)$$

and our purpose is to find its asymptotic value as $N \rightarrow \infty$.

We shall use the following obvious remark. Let A be a product of several functions of N , say, a, b, \dots, c . If $\alpha, \beta, \dots, \gamma$ are respectively asymptotic to a, b, \dots, c , then the product $\alpha \beta \dots \gamma$ will be asymptotic to A . To find the asymptotic value of $P(\Omega')$ we shall consider it as a product of several functions of N and find an asymptotic value of each of them. We shall start by considering the expression

$$\text{Writing} \quad P = p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} \quad (16)$$

$$\text{then} \quad p_i = (1 + x_i) q_i, \quad (17)$$

$$\begin{aligned} \log P &= \sum_{i=1}^k n_i \log q_i + \sum_{i=1}^k n_i \log (1 + x_i) = \\ &= \sum_{i=1}^k n_i \log q_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^k n_i x_i^2 + \frac{1}{3} \sum_{i=1}^k \frac{n_i x_i^3}{(1 + \theta_i x_i)^3} \end{aligned} \quad (18)$$

since whatever be x_i , we may write

$$\log(1 + x_i) = x_i - \frac{1}{2} x_i^2 + \frac{1}{3} \frac{x_i^3}{(1 + \theta_i x_i)^3}, \quad 0 \leq \theta_i \leq 1 \quad (19)$$

and because $\sum_{i=1}^k n_i x_i = 0$. We shall now find the upper and the lower limit of the remainder,

$$R = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^k \frac{n_i x_i^3}{(1 + \theta_i x_i)^3} \quad (20)$$

In view of the condition (9) the values of x 's in which we are interested will satisfy the condition

$$\sum_{i=1}^k n_i x_i^2 \leq \chi_0^2 \quad (21)$$

and consequently

$$|x_i| \leq \frac{\chi_0}{\sqrt{n_i}} \leq \frac{\chi_0}{\sqrt{N} q_0} \quad (22)$$

where q_0 is the smallest of the numbers q_1, q_2, \dots, q_k . It follows that if N is sufficiently large, the absolute value of x 's can be made as small as desired and then < 1 . Hence since $|x_i| < 1$, it follows that

$$\frac{n_i x_i^3}{(1+x_i)^3} \leq \frac{n_i x_i^3}{(1+\theta_i x_i)^3} \leq n_i x_i^3 \quad (23)$$

and

$$\frac{1}{3} \sum_{i=1}^k \frac{n_i x_i^3}{(1+x_i)^3} \leq R \leq \frac{1}{3} \sum_{i=1}^k n_i x_i^3 \quad (24)$$

We shall first find the maximum value of $\frac{1}{3} \sum_{i=1}^k n_i x_i^3$ subject to the conditions

$$\sum_{i=1}^k n_i x_i^2 = \chi^2 \quad \text{and} \quad \sum_{i=1}^k n_i x_i = 0 \quad (25)$$

Differentiating the function

$$\frac{1}{3} \sum_{i=1}^k n_i x_i^3 + \alpha \sum_{i=1}^k n_i x_i^2 + \beta \sum_{i=1}^k n_i x_i \quad (26)$$

and equating the derivatives to zero, we have

$$n_i x_i^2 + 2 \alpha n_i x_i + \beta n_i = 0 \quad (27)$$

Summing (27) for all values of i we have

$$\chi^2 + N\beta = 0, \quad \text{or} \quad \beta = -\frac{\chi^2}{N} \quad (28)$$

Solving (27) for x_i we have

$$x_i = -\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 - \beta} = -\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 + \frac{\chi^2}{N}} \quad (29)$$

showing that for the maximum or minimum solution the x 's will all take one or the other of two values corresponding to the different signs of the square root. Multiplying (29) by n_i and summing for all values of i we have

$$\sum_{i=1}^k n_i x_i = N_1 \{ \sqrt{\alpha^2 - \beta} - \alpha \} - N_2 \{ \sqrt{\alpha^2 - \beta} + \alpha \} = 0 \quad (30)$$

where N_1 , and N_2 , are the sums of n 's corresponding to the two values of the x 's.

Solving (30) we find that

$$\alpha = \pm \frac{\chi}{2\sqrt{N}} \frac{|N_1 - N_2|}{\sqrt{N_1 N_2}} \quad (31)$$

Finally multiplying the equations (27) by x_i , and adding we have

$$\sum_{i=1}^k n_i x_i^3 = -2\alpha \chi^2 = \mp \frac{\chi^3}{\sqrt{N}} \frac{|N_1 - N_2|}{\sqrt{N_1 N_2}} \quad (32)$$

To make (32) the maximum solution we must take the positive sign and give to $\frac{|N_1 - N_2|}{\sqrt{N_1 N_2}}$ its greatest possible value. This, it

is easily seen, is equal to $\frac{1 - 2q_0}{\sqrt{q_0 - q_0^2}}$.

The lower limit of R in (24) is given as follows:

$$\begin{aligned} R &\geq \frac{1}{3} \sum_{i=1}^k \frac{n_i x_i^3}{(1+x_i)^3} \geq -\frac{1}{3} \sum_{i=1}^k \frac{n_i |x_i^3|}{(1-|x_i|)^3} \geq \\ &\geq -\frac{1}{3} \chi_0^3 \sum_{i=1}^k \frac{1}{\sqrt{n_i} (1-\chi_0/\sqrt{N}q_0)^3} \geq -\frac{k \chi_0^3}{3\sqrt{N}q_0} \frac{1}{(1-\chi_0/\sqrt{N}q_0)^3} \end{aligned} \quad (33)$$

It follows that, say

$$-I_1 = -\frac{k}{3(1-\chi_0/\sqrt{N}q_0)^3} \frac{\chi_0^3}{\sqrt{N}q_0} \leq R \leq \frac{1-2q_0}{3\sqrt{1-q_0}} \frac{\chi_0^3}{\sqrt{N}q_0} = I_2 \text{ (say)} \quad (34)$$

Writing $R = \log(1 + \varepsilon'_N)$ then $|\varepsilon'_N| \leq \varepsilon_N$, where ε_N is the largest of the two numbers $e^{I_1} - 1$ and $e^{I_2} - 1$ and is thus independent of the position of the population point inside the region Ω and $\rightarrow 0$ as $N \rightarrow \infty$. Consequently, owing to (18)

$$P = q_1^{n_1} q_2^{n_2} \dots q_k^{n_k} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} (1 + \varepsilon'_N) \quad (35)$$

for every set of values of p 's satisfying the condition $\chi^2 \leq \chi_0^2$.

Consider now the other factor in the numerator of (12), namely $\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1})$. According to our assumptions this function is positive and continuous at the point $p_s = q_s$ ($s = 1, 2, \dots, k-1$), and therefore, whatever be the positive number η , we can always find a sufficiently small positive number δ , such that if

$$|p_i - q_i| < \delta \tag{36}$$

then

$$|\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) - \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})| < \eta \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \tag{37}$$

It can however be shown that whatever is η , the condition (36) will be satisfied for every population for which $\chi \leq \chi_0$, provided that N is sufficiently large. For since

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \leq \chi_0^2 \tag{38}$$

it follows that

$$N \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \leq \chi^2 \leq \chi_0^2 \tag{39}$$

and thus

$$|p_i - q_i| \leq \frac{\chi_0}{\sqrt{N}} \sqrt{q_i} < \frac{\chi_0}{\sqrt{N}} \tag{40}$$

Thus the numbers χ_0, η and δ being fixed, it is always possible to choose N large enough to satisfy the inequalities (36) and (37) for all populations for which $\chi \leq \chi_0$. We may therefore write

$$\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) (1 + \eta') \tag{41}$$

where $|\eta'| \leq \eta$ for every system of p 's satisfying the condition $\chi \leq \chi_0$.

From (35), (41) we see that the probability *a posteriori* that the population point p_1, p_2, \dots, p_{k-1} is contained in a region Ω' lying within the region Ω for which $\chi \leq \chi_0$, may be written

$$\begin{aligned} P(\Omega') &= \iint \dots \iint_{\Omega'} \Psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) dp_1 \dots dp_{k-1} = \\ &= \frac{\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) q_1^{n_1} q_2^{n_2} \dots q_k^{n_k}}{F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})} \times \\ &\times \iint \dots \iint_{\Omega'} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} (1 + \epsilon'_N) (1 + \eta') dp_1 \dots dp_{k-1} \end{aligned} \tag{42}$$

As the asymptotic value of the integral on the right-hand side is obviously the integral

$$\int \int \dots \int_{\Omega'} e^{-\frac{1}{2}\lambda^2} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (43)$$

it remains to consider the denominator

$$F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) = \int \int \dots \int_{\tau} \psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (44)$$

which we shall show is asymptotic to

$$F = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \int \int \dots \int_{\tau} p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (45)$$

Clearly it will be sufficient to prove that for any positive value ε it is always possible to find a value N_0 such that for $N \geq N_0$ we have

$$\frac{F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})}{F} = \frac{1 + \gamma_1}{1 + \gamma_2} \quad (46)$$

where $|\gamma_i| < \varepsilon$.

Since the product P is a continuous function with a single maximum at the point $p_i = q_i$ ($i = 1, 2, \dots, k-1$) namely

$$P_0 = q_1^{n_1} q_2^{n_2} \dots q_k^{n_k} \quad (47)$$

we shall consider the hypersurfaces

$$P = \lambda^N \quad (48)$$

where λ is a constant such that $0 < \lambda^N < P_0$. These hypersurfaces are closed, surrounding the point $p_i = q_i$, ($i = 1, 2, \dots, k-1$) to which they tend as λ^N is increased towards P_0 . Choose now a number λ_1^N , such that for all points p_1, p_2, \dots, p_{k-1} inside the corresponding hypersurface

$$P = \lambda_1^N \quad (49)$$

we shall have

$$|\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) - \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})| < \frac{1}{2} \varepsilon \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \quad (50)$$

This is possible, since the function ϕ is positive and continuous at the sample point. Now let $\lambda_1^N < \lambda_2^N < P_0$, and call τ_1 that part of the region τ (defined by (14)) which lies outside the hypersurface (49), and τ_2 that part of τ which lies inside

$$P = \lambda_2^N \quad (51)$$

Then

$$\begin{aligned} F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) &= \\ &= \iint_{\tau-\tau_1} \dots \int \phi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 dp_2 \dots dp_{k-1} + \\ &+ \iint_{\tau_1} \dots \int \phi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 dp_2 \dots dp_{k-1} = \\ &= I_1 + I_2 \text{ (say)} \end{aligned} \quad (52)$$

Using (50) we may write, where $|z_1| < \frac{1}{2}$ ϵ

$$I_1 = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) (1 + z_1) \iint_{\tau-\tau_1} \dots \int p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (53)$$

We have further

$$\begin{aligned} &\iint_{\tau-\tau_1} \dots \int p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} > \\ &> \iint_{\tau_2} \dots \int p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} > \lambda_2^N V_2 \end{aligned} \quad (54)$$

where V_2 is the volume of the region τ_2 . Since the hypersurface (51) may be written

$$p_1^{q_1} p_2^{q_2} \dots p_k^{q_k} = \lambda_2 \quad (55)$$

it is independent of N and therefore V_2 is independent of N . Now

$$I_2 < \lambda_1^N \iint_{\tau_1} \dots \int \phi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1}) dp_1 \dots dp_k \leq \lambda_1^N \quad (56)$$

It follows therefore, using (53), (54) and (56) that

$$\begin{aligned} &F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) = \\ &= \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) (1 + z_1 + z_2) \iint_{\tau-\tau_1} \dots \int p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \end{aligned} \quad (57)$$

where

$$z_2 = I_2 \left\{ \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \int \dots \int_{\tau-\tau_1} p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \right\}^{-1} < \\ < \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} \right)^N \left\{ V_2 \psi(q_1 \dots q_{k-1}) \right\}^{-1} \quad (58)$$

All the quantities on the right-hand side of (58) except N are fixed, and therefore if N is sufficiently large, say $N > N_0'$, we shall have

$0 \leq z_2 < \frac{1}{2} \varepsilon$, and writing $z_1 + z_2 = \eta_{11}$ we obtain from (57)

$$F_\psi(q_1, \dots, q_{k-1}) = \\ = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) (1 + \eta_{11}) \int \dots \int_{\tau-\tau_1} p_1^{n_1} \dots p_k^{n_k} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (59)$$

where $|\eta_{11}| < \varepsilon$. But

$$F = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) \int \dots \int_{\tau} P dp_1 \dots dp_{k-1} = \\ = \psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1}) (1 + \eta_{12}) \int \dots \int_{\tau-\tau_1} P dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (60)$$

where, using (54)

$$0 < \eta_{12} = \frac{\int \dots \int_{\tau_1} P dp_1 \dots dp_{k-1}}{\int \dots \int_{\tau-\tau_1} P dp_1 \dots dp_{k-1}} < \frac{V_1}{V_2} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} \right)^N \quad (61)$$

V_1 being the volume of the region τ_1 , which equally to V_2 will be independent of N . If now we take N sufficiently large, say $N > N_0''$, we shall have $\eta_{12} < \varepsilon$. Let N_0 be the greater of the numbers N_0' and N_0'' . Then for $N > N_0$ we shall have both $|\eta_{11}| < \varepsilon$ and $\eta_{12} < \varepsilon$ and consequently from (59) and (60), as $N \rightarrow \infty$

$$\frac{F_\psi(q_1, q_2, \dots, q_{k-1})}{F} = \frac{1 + \eta_{11}}{1 + \eta_{12}} \rightarrow 1. \quad (62)$$

Having thus found asymptotic values of all factors constituting the probability $P(\Omega')$ we may turn to the formula (42) and write

$$P(\Omega') \sim \frac{q_1^{n_1} q_2^{n_2} \dots q_k^{n_k} \int \dots \int_{\Omega'} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}}{\int \dots \int_{\tau} P dp_1 \dots dp_{k-1}} \quad (63)$$

We notice further that

$$\int \dots \int_{\omega} P dp_1 \dots dp_{k-1} = \frac{n_1! n_2! \dots n_k!}{(N+k-1)!} \quad (64)$$

Applying Stirling's Theorem to the product

$$\frac{(N+k-1)! \prod_{i=1}^k q_i^{n_i}}{n_1! n_2! \dots n_k!} \quad (65)$$

we see that it is asymptotic to $(N/2\pi)^{\frac{k-1}{2}} (q_1 q_2 \dots q_k)^{-\frac{1}{2}}$. As we shall see below this expression is equal to the inverse of the integral

$$\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 dp_2 \dots dp_{k-1}. \quad (66)$$

This result having been established, we shall have proved the Lemma, namely that

$$P(\Omega') \sim \frac{\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}}{\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}} \quad (67)$$

For a given order of approximation, N depends upon the value chosen for χ_0 and upon the variability of the function ψ at the sample point $p_i = q_i$ ($i=1, 2, \dots, k-1$).

4. The integral Z and the Theorem II.

We shall now proceed to calculate the integral

$$Z = \int \dots \int_{\Omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (68)$$

and then, putting $\chi_0 \rightarrow \infty$, obtain the value of

$$\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (69)$$

This integral, Z , is known to be proportional to

$$\int_0^{\chi_0} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} \chi^{k-2} d\chi \quad (70)$$

Let

$$B_i = A_i^{-\frac{1}{2}} \quad (i = 1, 2, \dots, k-1) \quad (77)$$

and write

$$\begin{aligned} y_1 &= B_1 \chi \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \cos \varphi_3 \cos \varphi_2 \cos \varphi_1 \\ y_2 &= B_2 \chi \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \cos \varphi_3 \cos \varphi_2 \sin \varphi_1 \\ y_3 &= B_3 \chi \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \cos \varphi_3 \sin \varphi_2 \\ y_4 &= B_4 \chi \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \sin \varphi_3 \\ &\dots \\ &\dots \\ y_{k-2} &= B_{k-2} \chi \cos \varphi_{k-2} \sin \varphi_{k-3} \\ y_{k-1} &= B_{k-1} \chi \sin \varphi_{k-2} \end{aligned} \quad (78)$$

We see that whatever are the values of the variates $\varphi_1, \varphi_2, \dots, \dots, \varphi_{k-2}$,

$$\sum_{i=1}^{k-1} A_i y_i^2 = \chi^2 \quad (79)$$

and consequently the region Ω_1 is transformed into the region Ω_2 limited by the inequalities

$$0 \leq \chi < \chi_0; 0 \leq \varphi_i \leq 2\pi; -\frac{1}{2}\pi \leq \varphi_i \leq \frac{1}{2}\pi \quad (i = 1, 2, \dots, k-2) \quad (80)$$

the limits of every variable being independent of the values of the other variables.

The calculation of the integral Z is now simplified. It is found that

$$\left| \frac{\partial (y_1, y_2, \dots, y_{k-1})}{\partial (\chi, \varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_{k-2})} \right| = \chi^{k-2} \prod_{i=1}^{k-1} B_i \prod_{s=2}^{k-2} \cos^{s-1} \varphi_s \quad (81)$$

and thus

$$\begin{aligned} Z &= 2\pi \prod_{t=1}^{k-1} \left(\sum_{s=1}^t q_s B_t \right) \prod_{i=2}^{k-2} \int_{-\frac{\pi}{2}}^{+\frac{\pi}{2}} \cos^{i-1} \varphi_i d\varphi_i \int_0^{\chi_0} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi = \\ &= C \int_0^{\chi_0} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \end{aligned} \quad (82)$$

To calculate C we notice that

$$\prod_{t=1}^{k-1} \left(B_t \sum_{s=1}^t q_s \right) = \frac{\sqrt{\prod_{s=1}^k q_s}}{N^{\frac{k-1}{2}}} \quad (83)$$

and for the remaining terms in C , we have easily

$$2\pi \prod_{i=2}^{k-2} \int_{-\frac{\pi}{2}}^{+\frac{\pi}{2}} \cos^{i-1} \varphi_i d\varphi_i = (2\pi)^{\frac{k-1}{2}} \left\{ \int_0^{\infty} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} d\chi \right\}^{-1} \quad (84)$$

Substituting (83) and (84) into (82) we have finally

$$Z = \left(\frac{2\pi}{N} \right)^{\frac{k-1}{2}} \sqrt{q_1 q_2 \dots q_k} \frac{\int_0^{\chi_0} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} d\chi} \quad (85)$$

It follows on putting $\chi_0 \rightarrow \infty$ that

$$\int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} = \left(\frac{2\pi}{N} \right)^{\frac{k-1}{2}} \sqrt{q_1 q_2 \dots q_k} \quad (86)$$

— the result referred to on p. 13 above. We have therefore established the original Lemma and also have shown by the transformations that the *a posteriori* probability that the population proportions satisfy the condition $\chi \leq \chi_0$ tends to

$$I(\Omega) = \frac{\int_0^{\chi_0} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{k-2} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} d\chi} \quad (87)$$

when N is indefinitely increased, $q_1 q_2 \dots q_{k-1}$, the sample proportions remaining constant. This result, which is really an easy corollary of the Lemma may be considered as a „pendant“ to Pearson's well known test for goodness of fit. We may set it out as

Theorem II. Whatever be the *a priori* probability law ψ satisfying the two conditions of being positive and continuous at the sample point q_1, q_2, \dots, q_{k-1} , the *a posteriori* probability that the po-

pulation point p_1, p_2, \dots, p_{k-1} satisfies the condition $\chi \leq \chi_0$ tends to (87) as $N \rightarrow \infty$, the ratios q_1, q_2, \dots, q_{k-1} remaining constant.

5. The Proof of the Fundamental Theorem.

We proceed now to the proof of the Fundamental Theorem. It would follow as an immediate corollary from the Lemma if it were known that for a sufficiently large χ_0 the region Ω contains $\omega(W)$. That not being so, we have a short proof to carry out. We start by noting that it follows from the Lemma, that whatever be χ_0 and the region Ω' contained in Ω , it is possible to choose a sufficiently large number N_0 such, that if the size of the sample $N > N_0$ (for constant ratios q), then the *a posteriori* probability $P(\Omega')$ of having the population point inside the region Ω' differs from the ratio $I(\Omega')$ by less than an arbitrary positive number ϵ . Since the ratio $I(\Omega')$ is never larger than unity, this statement follows immediately from the Lemma.

If as before, ω denotes the complete $k-1$ — dimensioned space of p 's range from $-\infty$ to $+\infty$, and if Ω is the portion of it contained within the hypersurface $\chi = \chi_0$ and $\omega(W), \Omega(W)$ the parts of ω and Ω respectively, for which the values of θ 's are contained in W , we shall write $P(\omega W), P(\Omega W)$ etc. for the probability *a posteriori* that the population point lies respectively in region $\omega(W), \Omega(W)$ etc.

Choose χ_0 sufficiently large to make

$$1 - I(\Omega) < \epsilon \tag{88}$$

Then take N so large that whatever be the region Ω' contained in Ω

$$|P(\Omega') - I(\Omega')| < \epsilon \tag{89}$$

That this is possible we know as a result from the above remark. Clearly $\omega(W)$ contains $\Omega(W)$, and therefore from (88)

$$0 \leq I(\omega W) - I(\Omega W) < \epsilon \tag{90}$$

It follows from (88) and (89) that $1 - P(\Omega) < 2\epsilon$ and therefore

$$0 \leq P(\omega W) - P(\Omega W) < 1 - P(\Omega) < 2\epsilon \tag{91}$$

Further as a special case of (89) we have

$$-\epsilon < P(\Omega W) - I(\Omega W) < \epsilon \tag{92}$$

From inequalities (90), (91) and (92) we have the result

$$-2\varepsilon < P(\omega W) - I(\omega W) < 3\varepsilon \tag{93}$$

and as ε is arbitrarily small, we see that the Fundamental Theorem is proved. We proceed now to the Theorem III giving the limiting *a posteriori* probability law of linear functions of p 's which will be further used for testing of composite hypotheses.

6. The Theorem III.

Consider the integral

$$\gamma = \text{const} \times \int \int \dots \int_{\omega(W)} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dx_1 dx_2 \dots dx_{k-1} \tag{94}$$

where

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2 \tag{95}$$

and where the region of integration includes all systems of values of variates for which $s < k - 1$ linear functions

$$y_i = a_{i1} x_1 + a_{i2} x_2 + \dots + a_{i,k-1} x_{k-1} \tag{96}$$

have values included in a region W . We shall suppose that none of the y 's is a linear function of others, that is to say that at least one determinant of s -th order of the matrix

$$\begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots & \dots & \dots & a_{1, k-1} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots & \dots & \dots & a_{2, k-1} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{s1} & a_{s2} & a_{s3} & \dots & \dots & \dots & a_{s, k-1} \end{vmatrix} \tag{97}$$

is not equal to zero. As the order in which the variates are numerated is of no importance, we may assume that

$$\Delta = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & \dots & \dots & a_{1s} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & \dots & \dots & a_{2s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{s1} & a_{s2} & \dots & \dots & \dots & a_{ss} \end{vmatrix} \neq 0 \tag{98}$$

Consider further the square of the matrix (97) it is to say the determinant

$$\delta = \begin{vmatrix} b_{11} & b_{12} & \dots & \dots & \dots & b_{1s} \\ b_{21} & b_{22} & \dots & \dots & \dots & b_{2s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ b_{s1} & b_{s2} & \dots & \dots & \dots & b_{ss} \end{vmatrix} \quad (99)$$

where

$$b_{ik} = \sum_{t=1}^{k-1} a_{it} a_{kt} = b_{ki}$$

As it is known the determinant δ is equal to the sum of squares of all s -th order determinants of the matrix (97) and thus, owing to (98) is not equal to zero. Denote by δ_{ik} the minor of δ corresponding to the k -th column and i -th row. We have then the following

Theorem III. If the functions y_i satisfy the above conditions, then

$$\gamma = \text{const} \times \int \int \dots \int_W e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} dy_1 dy_2 \dots dy_s \quad (100)$$

where

$$\chi_1^2 = \frac{1}{\delta} \sum_{i=1}^s \sum_{k=1}^s \delta_{ik} y_i y_k$$

We shall start with the remark that we may suppose that for every $1 \leq j \leq k-1$ there exists at least one value of i , $0 < i \leq s$, for which the coefficient $a_{ij} \neq 0$. In fact if there were an x_j such that every function y_i would be independent of x_j , then calculating γ we could integrate with regard to that x_j from $-\infty$ to $+\infty$ and get an integral of the form (94) in which the exponent χ^2 would not depend upon x_j .

Introduce a new system of variables z_1, z_2, \dots, z_{k-1} connected with x 's by means of formulae:

$$x_i = \sum_{t=1}^s a_{it} z_t + \sum_{t=s+1}^{k-1} \alpha_{it} z_t \quad (101)$$

$$(i = 1, 2, \dots, k-1)$$

where α 's are to satisfy the following conditions: 1) for every

$$s < t \leq k-1, s < r \leq k-1 \text{ and } t \neq r$$

$$\sum_{i=1}^{k-1} \alpha_{t,i} \alpha_{r,i} = 0 \quad (102)$$

2) for every $1 \leq t \leq s$ and $s < r \leq k-1$

$$\sum_{i=1}^{k-1} \alpha_{t,i} \alpha_{r,i} = 0 \quad (103)$$

and, 3) for every $s < t \leq k-1$

$$\sum_{i=1}^{k-1} \alpha_{t,i}^2 = 1 \quad (104)$$

It is always possible to find such α 's. Fix for instance $\alpha_{s+1,i} = 0$ for $i > s+1$ and then solve s equations

$$\sum_{i=1}^s \alpha_{t,i} \alpha_{s+1,i} = -\alpha_{t,s+1} \alpha_{s+1,s+1} \quad (t=1, 2, \dots, s) \quad (105)$$

where $\alpha_{s+1,s+1}$ is for a moment undetermined. Owing to our assumptions concerning the determinant (98) and the coefficients α_{ij} , the solutions will be proportional to $\alpha_{s+1,s+1}$ and not all equal to zero. Now

we determine $\alpha_{s+1,s+1}$ to have $\sum_{i=1}^s \alpha_{s+1,i}^2 = 1$, which is very easy to

do. We proceed further to the calculation of $\alpha_{s+2,i}$. Fixing $\alpha_{s+2,i} = 0$ for $i > s+2$, leaving $\alpha_{s+2,s+2}$ for a moment undetermined and solving the system of $s+1$ linear equations

$$\sum_{i=1}^{s+1} \alpha_{t,i} \alpha_{s+2,i} = -\alpha_{t,s+2} \alpha_{s+2,s+2} \quad (t=1, 2, \dots, s) \quad (106)$$

$$\sum_{i=1}^{s+1} \alpha_{s+1,i} \alpha_{s+2,i} = 0$$

we have the solutions for $\alpha_{s+2,i}$ proportional to $\alpha_{s+2,s+2}$ and, owing to the same assumptions, not all equal to zero. We find then for $\alpha_{s+2,s+2}$

a suitable value to have $\sum_{i=1}^{s+2} \alpha_{s+2,i}^2 = 1$.

One can easily see that the process cannot be stopped and that it is always possible to find α 's satisfying the conditions 1), 2), 3). Now if we multiply (101) into coefficients of any of functions (96) and add, we shall have

$$y_i = \sum_{j=1}^{k-1} a_{ij} x_j = \sum_{t=1}^s z_t \sum_{j=1}^{k-1} a_{ij} a_{tj}, \quad (107)$$

s linear equations connecting y 's with z_1, z_2, \dots, z_s . The determinant of the system (107) is obviously $\delta \neq 0$. Thus these equations can be solved with regard to z 's and

$$z_t = \frac{1}{\delta} \sum_{i=1}^s \delta_{t,i} y_i \quad (108)$$

Let us now calculate the expression of $\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2$. We have

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^s b_{ij} z_i z_j + \sum_{t=s+1}^{k-1} z_t^2 \quad (109)$$

the very important equation which will be used below. It shows

that for fixed values of y 's the minimum value of $\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2$ is

$$\chi_1^2 = \sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^s b_{ij} z_i z_j \quad (110)$$

In fact fixing the values of y 's we fix at the same time those of z_i for $i=1, 2, \dots, s$, the remaining z 's being quite independent of y 's. Thus the fixed values of y 's determine perfectly the value of the first term on the right-hand side of (109) and leave the other positive,

at least non negative term $\sum_{t=s+1}^{k-1} z_t^2$ entirely undetermined. To

have the minimum value of χ^2 we have thus to put $z_t = 0$ for $t = s + 1, s + 2, \dots, k - 1$.

Turning to the integral (94) we see that the introduction of z 's will only change the constant factor, introducing a new component

$\Delta \prod_{i=s+1}^{k-1} \alpha_{ii} \neq 0$ equal to the determinant of (101), and influence the exponent χ^2 . We have thus

$$\gamma = \text{const} \times \int \int \dots \int_{\omega_1(W)} e^{-\frac{1}{2} \left(\chi_1^2 + \sum_{i=s+1}^{k-1} z_i^2 \right)} dz_1 dz_2 \dots dz_{k-1} \quad (111)$$

where the region of integration with regard to every z_{s+j} is from $-\infty$ to $+\infty$ and with regard to z_i for $1 \leq i \leq s$ is limited by the condition that respective values of y 's must be included in W . We may thus integrate with regard to every z_i for $s < i$ from $-\infty$ to $+\infty$, which will only influence the constant factor before the integral and change the expression of χ^2 into its minimum value (110). Thus

$$\gamma = \text{const} \times \int \int \dots \int_{\omega_s(W)} e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} dz_1 dz_2 \dots dz_s \quad (112)$$

It remains to introduce y 's instead of z 's. We do it using (108). The transformation will change the constant factor before the integral and the expression of χ_1^2 . Using Euler's theorem concerning homogeneous functions we have

$$\chi_1^2 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^s z_i \frac{d\chi_1^2}{dz_i} = \sum_{i=1}^s y_i z_i \quad (113)$$

and then, using (108)

$$\chi_1^2 = \frac{1}{\delta} \sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^s \delta_{ij} y_i y_j \quad (114)$$

Thus finally

$$\gamma = \text{const} \times \int \int \dots \int_W e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} dy_1 dy_2 \dots dy_s \quad (115)$$

Q. F. D.

III. Testing of Composite Hypotheses¹.

7. Linear case.

Consider now the composite hypothesis H , namely that s func-

¹ The definition of composite hypotheses is given in the paper, already referred to, J. Neyman and E. S. Pearson: „On the Use and Interpretation...“ Part II. *Biometrika* Vol. XX-A.

tions of p 's of the form

$$\theta_i = \sqrt{N} \{u_{i1}(p_1 - q_1) + u_{i2}(p_2 - q_2) + \dots + u_{ik}(p_k - q_k)\} \quad (116)$$

$i = 1, 2, \dots, s$

where u 's are some constant factors, have some definite values, say $\bar{\theta}_i$. To test this hypothesis starting from principles exposed in the section 2., we have to calculate its likelihood, say $\lambda_H = \lambda_0$ and then to estimate the probability of rejecting a true hypothesis, calculating the difference

$$1 - P \quad (117)$$

where P is the probability of having

$$\lambda_H \geq \lambda_0 \quad (118)$$

The problem will be considerably simplified if instead of hyper-space ω of p 's we introduce that of x 's, say ω_1 . Doing so we shall use the formulae (71), (73), and (74), where we shall put

$$\sqrt{A_i} y_i = x_i \quad i = 1, 2, \dots, k - 1 \quad (119)$$

As y 's are linear and homogeneous functions of differences $(p_i - q_i)$ and owing to (116) we shall have the expression of θ_i in x 's as follows

$$\theta_i = b_{i1} x_1 + b_i x_2 + \dots + b_{ik-1} x_{k-1} \quad (120)$$

where the b 's are some constants independent of N . We shall now prove

Theorem IV. The likelihood of the composite hypothesis H , that the functions θ_i , ($i = 1, 2, \dots, s$) have definite values $\bar{\theta}_i$, tends to

$$e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} \quad (121)$$

as $N \rightarrow \infty$, where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2 \quad (122)$$

calculated under the conditions that

$$\theta_i = \bar{\theta}_i \quad i = 1, 2, \dots, s \quad (123)$$

We must prove first the following important proposition. Let Σ be the sample point in the hyperspace of p 's, and L — a straight line passing through Σ . Let further r be the distance of a point A on L from Σ and λ — the likelihood

$$\lambda = \prod_{i=1}^k \left(\frac{p_i}{q_i} \right)^{n_i} \tag{124}$$

of the simple hypothesis represented by the point A . The proposition is: the likelihood λ is a decreasing function of r .

Let us deduce the expression of λ as function of r . For that purpose we shall introduce new coordinates $r, \varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_{k-2}$, using formulae

$$\begin{aligned} p_1 - q_1 &= r \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \cos \varphi_2 \cos \varphi_1 = a_1 r \\ p_2 - q_2 &= r \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \cos \varphi_2 \sin \varphi_1 = a_2 r \\ p_3 - q_3 &= r \cos \varphi_{k-2} \cos \varphi_{k-3} \dots \sin \varphi_2 = a_3 r \\ &\dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \\ p_{k-1} - q_{k-1} &= r \sin \varphi_{k-2} = a_{k-1} r \end{aligned} \tag{125}$$

The expression for the difference $p_k - q_k$ will be

$$p_k - q_k = -r \sum_{i=1}^{k-1} a_i \tag{126}$$

Squaring (125) and adding we have

$$\sum_{i=1}^{k-1} (p_i - q_i)^2 = r^2 \tag{127}$$

thus r is in fact the distance between A and Σ . The expression of $\log \lambda$ in r will be

$$\log \lambda = \sum_{i=1}^{k-1} n_i \log \left(1 + \frac{r a_i}{q_i} \right) + n_k \log \left(1 - \frac{r \sum_{i=1}^{k-1} a_i}{q_k} \right) \tag{128}$$

Differentiating it with regard to r we easily have

$$\frac{d \log \lambda}{dr} = N \left\{ \sum_{i=1}^{k-1} \frac{a_i q_i}{q_i + r a_i} - \frac{q_k \sum_{i=1}^{k-1} a_i}{q_k - r \sum_{i=1}^{k-1} a_i} \right\} \tag{129}$$

As $0 < p_i < 1$, we have

$$\begin{aligned} 0 < q_i + r a_i &< 1 & i = 1, 2 \dots k-1 \\ 0 < q_k - r \sum_{i=1}^{k-1} a_i = p_k &< 1 \end{aligned} \quad (130)$$

Hence all denominators in (129) are positive. As to numerators, they may be positive or negative. If $r=0$, the derivative (129) is zero. Suppose now that r is increased and is positive. We easily see that the negative terms of (129) will be increased in their absolute value and all positive terms will be decreased. Thus for $r > 0$ the derivative

$$\frac{d \log \lambda}{dr} < 0 \quad (131)$$

and the function λ is decreasing if r increases.

Turn now to the hypothesis H and choose χ_0 large enough so that the region in which $\chi^2 \leq \chi_0^2 - 3\epsilon$ includes points satisfying the conditions (123). This can be easily done as to every equation (123) there corresponds in the hyperspace of x 's a definite region independent of N . Thus the position will not be altered as $N \rightarrow \infty$. Now choose N sufficiently large for the validity of the formula (35), namely

$$p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_k^{n_k} = q_1^{n_1} q_2^{n_2} \dots q_k^{n_k} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} (1 + \epsilon'_N) \quad (132)$$

where $|\epsilon'_N| < \epsilon$, ϵ being an arbitrarily small positive number — this for every point inside Ω , where $\chi^2 < \chi_0^2$. It will be more convenient to write the formula (132) in the form

$$\prod_{i=1}^k p_i^{n_i} = \prod_{i=1}^k q_i^{n_i} e^{-\frac{1}{2} (\chi^2 + \epsilon_i)} \quad (133)$$

where $|\epsilon_i| < \epsilon$ for every point inside Ω . The likelihood of a simple hypothesis represented by a point with coordinates

$$x_1, x_2, \dots, x_{k-1} \quad (134)$$

or

$$p_1, p_2, \dots, p_{k-1} \quad (135)$$

is

$$\lambda = \prod_{i=1}^k \left(\frac{p_i}{q_i} \right)^{n_i} \quad (136)$$

The likelihood of the composite hypothesis H being the maximum of likelihoods of simple hypotheses included in that composite one, is equal to the function (136) in a point, say A , satisfying the conditions (123). We shall prove that the point A lies inside the region Ω and that, therefore, the expression of the corresponding value of the likelihood λ_0 may be written in the form (133). Owing to the special choice of γ_0^2 there exist points say A' satisfying (123), for which $\chi^2 \leq \chi_0^2 - 3\epsilon$. The likelihood in these points will be

$$\lambda_{A'} > e^{-\frac{1}{2}(\chi_0^2 - 2\epsilon)} \quad (137)$$

Consider now points, say A'' on the hypersurface $\chi^2 = \chi_0^2 - \epsilon$ lying entirely in Ω and surrounding the points A' . The likelihood in every such point will be

$$\lambda_{A''} = e^{-\frac{1}{2}(\chi_0^2 - \epsilon + \epsilon')} < e^{-\frac{1}{2}(\chi_0^2 - 2\epsilon)} < \lambda_{A'} \quad (138)$$

If there were points satisfying (123), lying outside Ω and having $\lambda > \lambda_{A'}$, then the likelihood would not be a function monotonically decreasing in all directions starting from the sample point. Thus all points satisfying (123) and lying outside Ω have smaller likelihoods than some of those lying inside Ω . Therefore the point A lies inside Ω and its likelihood can be written in the form, say,

$$\lambda_A = \lambda_H = e^{-\frac{1}{2}(\chi_A^2 + \epsilon_A)} \quad (139)$$

where $|\epsilon_A| < \epsilon$. We shall now prove that

$$\lambda_H = e^{-\frac{1}{2}(\chi_1^2 + \eta)} \quad (140)$$

where $|\eta| < \epsilon$ and χ_1^2 is the minimum value of $\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - a_i)^2}{\chi_i^2}$,

calculated under the condition that θ_i have the hypothetical values $\bar{\theta}_i$. Consider a point satisfying the conditions (123) and having $\chi^2 = \chi_1^2$. Its likelihood will be

$$\lambda = e^{-\frac{1}{2}(\chi_1^2 + \epsilon_1)} \quad (141)$$

According to (139)

$$\chi_A^2 + \epsilon_A \leq \chi_1^2 + \epsilon_1 < \chi_1^2 + \epsilon \quad (132)$$

But

$$\chi_1^2 \leq \chi_A^2 \tag{143}$$

Hence

$$-\epsilon < \chi_A^2 - \chi_1^2 - |\epsilon_A| \leq \chi_A^2 - \chi_1^2 + \epsilon_A \leq \epsilon_1 < \epsilon \tag{144}$$

and denoting

$$\chi_A^2 - \chi_1^2 + \epsilon_A = \eta \tag{145}$$

we shall have

$$\lambda_H = e^{-\frac{1}{2}(\chi_1^2 + \eta)} \tag{146}$$

where $|\eta| < \epsilon$ and tends to nought when $N \rightarrow \infty$. Thus the Theorem IV is proved.

8. Non-linear case.

We shall now extend that theorem to the case when the functions θ_i' are not linear with regard to the differences $(p_j - q_j)$. Suppose that besides linear terms given in (116), the functions θ_i' have some additional ones of higher order, which we shall denote with a single letter $\xi_i'^1$. Thus the expression of θ_i' will be

$$\theta_i' = \sqrt{N} \left\{ \sum_{j=1}^k u_{ij} (p_j - q_j) + \xi_i' \right\} = \theta_i + \sqrt{N} \xi_i, \quad (i = 1, 2, \dots, s) \tag{147}$$

We shall prove that also in this case the likelihood of the hypothesis, H_1 , that the functions θ_i' have definite values $\bar{\theta}_i'$ tends to $e^{-\frac{1}{2}\chi_1^2}$ as N indefinitely increases.

In fact the expressions of θ_i' and θ_i in x 's are

$$\theta_i = \sum_{j=1}^{k-1} b_{ij} x_j; \quad \theta_i' = \sum_{j=1}^{k-1} b_{ij} x_j + \frac{1}{\sqrt{N}} \xi_i' = \theta_i + \frac{1}{\sqrt{N}} \xi_i' \tag{148}$$

where the b_{ij} are some constants independent of N and ξ_i' — some functions of x 's and of N , which however tend to finite limits as $N \rightarrow \infty$. To find the maximum likelihood under the condition that the θ 's have fixed definite values we have to solve the system of $k + s - 1$ equations

$$\frac{d\lambda}{dx_i} - \sum_{j=1}^s \alpha_j \left(\frac{d\theta_j}{dx_i} + \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{d\xi_j'}{dx_i} \right) = \frac{d\lambda}{dx_i} - \sum_{j=1}^s \alpha_j \left(b_{ij} + \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{d\xi_j'}{dx_i} \right) = 0 \tag{149}$$

$i = 1, 2, \dots, k-1$

¹ ξ_i' is independent of N .

$$\theta_j + \frac{1}{N} \xi'_j = \bar{\theta}'_j \quad j = 1, 2, \dots, s \quad (149)$$

As $N \rightarrow \infty$ the solutions of these equations tend to the solutions of

$$\begin{aligned} \frac{d\lambda}{dx_i} - \sum_{j=1}^s \alpha_j b_{ji} &= 0 & i = 1, 2, \dots, k-1 \\ \theta_j &= \bar{\theta}'_j & j = 1, 2, \dots, s \end{aligned} \quad (150)$$

which give the maximum likelihood under the condition that

$$\theta_j = \bar{\theta}'_j \quad j = 1, 2, \dots, s \quad (151)$$

Let A denote the point in the hyperspace of x 's in which $\theta_i = \bar{\theta}'_i$ ($i = 1, 2, \dots, s$) and having the maximum likelihood, say λ_A , further let A_1 denote the point in the same hyperspace in which $\theta'_i = \bar{\theta}'_i$ and having the maximum likelihood, say λ_{A_1} . The coordinates of A satisfy the equations (150) and the coordinates of A_1 —the equations (149). From the special form of these later equations it follows that whatever be $\delta > 0$, we can always find a sufficiently large N_1 , such that the distance between A and A_1 , say $d(AA_1)$ will be less than δ , provided $N > N_1$.

Fix now χ_0 and $N = N_2$ large enough in order that the region Ω may include both points A and A_1 and in order that for every point M inside Ω the value of the likelihood λ_M of the respective simple hypothesis

$$\lambda_M = e^{-\frac{1}{2}(\chi^2 + \varepsilon_M)} \quad (152)$$

where

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2 \quad \text{and} \quad |\varepsilon_M| < \varepsilon \quad (153)$$

ε being an arbitrarily small positive number. Denote by χ_M^2 the value of χ^2 corresponding to every point M inside the region Ω . χ_M^2 being a continuous function, we can always find a sufficiently small positive number δ , such that if the distance between two points M and M_1 is less than δ , then

$$\left| \chi_M^2 - \chi_{M_1}^2 \right| < \varepsilon \quad (154)$$

Now let N_0 be the larger of the two numbers N_1 and N_2 . Then for $N \geq N_0$ we shall have

$$d(AA_1) < \delta$$

$$\lambda_A = e^{-\frac{1}{2}(\chi^2_A + \epsilon_0)}, \lambda_{A_1} = e^{-\frac{1}{2}(\chi^2_{A_1} + \epsilon_1)}, |\epsilon_0| < \epsilon, |\epsilon_1| < \epsilon$$

$$|\chi^2_A - \chi^2_{A_1}| < \epsilon \tag{155}$$

Hence for the same values of $N > N_0$ it will be

$$\log \lambda_A - \log \lambda_{A_1} = -\frac{1}{2}(\chi^2_A - \chi^2_{A_1} + \epsilon_0 - \epsilon_1) = \eta \tag{156}$$

where $|\eta| < 3\epsilon$. Thus we have proved the following

Theorem V. If the functions θ'_i ($i = 1, 2, \dots, s$) have the form

$$\theta'_i = \theta_i + \sqrt{N} \xi_i \tag{157}$$

where $\frac{\theta_i}{\sqrt{N}}$ is a homogeneous linear polynomial in differences $(p_i - q_i)$, ($i = 1, 2, \dots, k$), with constant coefficients independent of N , and ξ_i contains only terms of higher than the first order with regard to differences $(p_j - q_j)$ and is also independent of N , then the likelihood of the composite hypothesis that the functions θ'_i have definite values $\bar{\theta}'_i$ tends to

$$e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} \tag{158}$$

as $N \rightarrow \infty$, where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2 \tag{159}$$

calculated on condition that $\theta_i = \bar{\theta}'_i$ ($i = 1, 2, \dots, s$).

The two theorems IV and V seem to be important as they allow to estimate approximately the likelihood of composite hypotheses in cases when the actual value of this likelihood is hardly obtainable.

9. The Control of Errors Kind 1.

To complete the testing of composite hypotheses according to the exposed principles, it will be necessary to estimate the probability *a posteriori*, P , that the sampled population satisfied the con-

dition $\lambda_H > \lambda_0$, where λ_H is the likelihood of the composite hypothesis under consideration in general, and λ_0 its actual value corresponding to the fixed hypothetical values of functions θ_i or θ'_i . We shall treat here only the case of the hypothesis H concerning the values of s functions θ_i linear with regard to differences $(p_j - q_j)$ as described in conditions of Theorem IV.

In cases when the observed sample is sufficiently big we may use the Fundamental Theorem and estimate P by means of the integral

$$I_Q = C \int \int \dots \int_{\omega(Q)} e^{-\frac{1}{2} \chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1} \quad (160)$$

where Q means the region in the hyperspace of θ 's in which $\lambda_H > \lambda_0$ and where $\omega(W)$ is the portion of the hyperspace of x 's in which the θ 's have values appertaining to W .

Let ε be an arbitrarily small number. According to Theorem IV, the likelihood

$$\lambda_0 = e^{-\frac{1}{2} (\chi_1^2 + \varepsilon)} \quad (161)$$

where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} x_i^2 \quad (162)$$

calculated under the condition that θ 's have the hypothetical values $\bar{\theta}$ and where $|\varepsilon_1| < \varepsilon$, provided N is sufficiently large. Denote generally by χ_2^2 the minimum value of χ^2 calculated under the condition that the θ 's have some definite values. Thus χ_1^2 will be a special value of χ_2^2 corresponding to $\theta_i = \bar{\theta}_i$. Let further

$$\chi_3^2 = \chi_1^2 - \varepsilon, \quad \chi_4^2 = \chi_1^2 + \varepsilon \quad (163)$$

and denote by Q_i ($i=3, 4$) the region in the hyperspace of θ 's where $\chi_2^2 \leq \chi_i^2$

As

$$e^{-\frac{1}{2} \chi_4^2} < \lambda_0 < e^{-\frac{1}{2} \chi_3^2} \quad (164)$$

the region Q will contain the region Q_3 and will be included in Q_4 . Thus we shall have

$$I_{Q_3} < I_Q < I_{Q_4}$$

As we shall see below, both extreme integrals $I(Q_3)$ and $I(Q_4)$ tend to the same limit as N indefinitely increases, namely,

$$I = \frac{\int_0^{\chi_1} \chi^{s-1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi} \quad (165)$$

Showing this we shall prove that the integral $I(Q)$ and thus the probability P tend to the same limit. This fact may be considered as a sufficient reason to use the value I for the estimation of the probability P

We shall have thus the

Theorem VI. Whatever are the independent functions θ (that is to say such that none of them is a linear function of others), the probability P tends to I when $N \rightarrow \infty$, provided the *a priori* probability law satisfies the two conditions a) and b) mentioned in the Fundamental Theorem.

Owing to Theorem III, the proof consists simply in the calculation of the integral

$$I(Q_i) = \frac{\int \int \dots \int_{\omega(Q_i)} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}}{\int \int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1 \dots dp_{k-1}} \quad (166)$$

where $\omega(Q_i)$ means the region in the hyperspace ω in which the functions θ have values appertaining to the region Q_i ($i=3, 4$).

Using the transformation (71) and then writing

$$\sqrt{A_t} y_t = x_t \quad (t=1, 2, \dots, k-1) \quad (167)$$

we shall transform (166) into

$$I(Q_i) = C \int \int \dots \int_{\omega_1(Q_i)} e^{-\frac{1}{2}\sum_{t=1}^{k-1} x_t^2} dx_1 dx_2 \dots dx_{k-1} \quad (168)$$

where C is to be chosen to have $I(Q_\infty) = 1$, if Q_∞ means the region Q corresponding to $\chi_1 \rightarrow \infty$. As to the region $\omega_1(Q_i)$ it is the portion of the hyperspace of x 's in which the functions θ transformed by means of (71) and (167) into functions of x 's, have values included in Q_i .

Owing to the established Theorem III, the calculation of $I(Q)$ is now reduced to that of

$$I(Q_i) = C \iint \dots \int_{Q_i} e^{-\frac{1}{2} \chi_i^2} d\theta_1 d\theta_2 \dots d\theta_s, \quad (169)$$

where Q_i means the portion of the hyperspace of θ 's in which $\chi_2^2 \leq \chi_i^2$. But the value of $I(Q_i)$ in the form (169) is known to be

$$I(Q_i) = \frac{\int_0^{\chi_i} \chi_1^{s-1} e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} d\chi_1}{\int_0^{\infty} \chi_1^{s-1} e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} d\chi_1} \quad (170)$$

Remembering that

$$\chi_3^2 = \chi_1^2 - \varepsilon \text{ and } \chi_4^2 = \chi_1^2 + \varepsilon \quad (171)$$

where $\varepsilon \rightarrow 0$ as $N \rightarrow \infty$, we see at once that both integrals $I(Q_3)$ and $I(Q_4)$ tend at the same time to I , hence the Theorem IV is established, and thus the probability of rejecting a true hypothesis is less than $1 - I(Q)$.

It is an extremely interesting fact that the same difference has been found as an estimate of the probability of committing an error kind 1 — this starting from a quite different point of view.

In fact there we considered the composite hypothesis that the group probabilities in the population, p , follow a certain law expressed by the relations

$$p_i = f_i(\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_c) \quad i = 1, 2, \dots, k \quad (172)$$

α 's being some parameters. Our method consisted in calculating the likelihood of that hypothesis and then in finding the approximation of the probability, P_1 , that sampling from a population following the hypothetical law (172), we should get a sample for which the likelihood of the hypothesis under consideration is larger than that observed. Obviously the probability of rejecting a true hypothesis is $< 1 - P_1$. The difference $1 - P_1$ has been considered as suitable for the estimation of the probability of rejecting a true hypothesis.

The interesting fact consists precisely in the circumstance that for P_1 the same expression has been found as in the present paper

that for P , namely (165), with the only difference that χ_1^2 meant previously the minimum value of

$$N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{p_i} \tag{173}$$

calculated under condition that the p 's follow the hypothetical law, and at present χ_1^2 means the minimum value of a different expression

$$N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \tag{174}$$

calculated under the same conditions.

However this difference is not an essential one. In fact, the two minimums of expressions (173) and (174) are approximately (for big N) equal to the logarithm of the likelihood $\lambda_{\bar{H}}$ of the composite hypothesis under consideration and as a result of the above Theorems IV and V we can affirm that

$$\text{Minimum} \left(N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{p_i} \right) \rightarrow \text{Minimum} \left(N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \right) \tag{175}$$

as $N \rightarrow \infty$. There exists a second difference, but this is an apparent one. It consists in the fact that it has been previously found¹

$$P_1 \sim C \int_0^{\chi_1} \chi^{k-c-2} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \tag{176}$$

while at present

$$P \sim C \int_0^{\chi_1} \chi^{s-1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \tag{177}$$

It is easy to see however that $k-c-2=s-1$ and thus that (for big N) the two solutions are identical.

This point seems to be very interesting. The question about testing hypotheses is not only a mathematical one. It depends highly upon some rather philosophical considerations. The mathe-

¹ Cfr. Appendix to Part II of the paper by J. Neyman and E. S. Pearson „On the Use and Interpretation...” Loc. cit.

matics will deduce formulae for testing hypotheses provided there are given sufficient principles to start with. The foundation of these principles does not belong to mathematics—they must be found as a result of analysis of conditions in which a common mind would or would not believe in a given hypothesis. And if a correctly proved theorem of mathematics cannot be rejected by any mathematician who understands the proof, the principles on which the testing of hypotheses is based may be rejected by any person, simply because they may **seem** to be wrong.

Now, if as in the present case, two different points of view on testing hypotheses lead to the same mathematical formula, the importance of the same is considerably increased.

Very probably Theorem VI could be extended to the case considered in Theorem V, when the composite hypothesis H concerned values of the functions θ_i' not necessarily linear with regard to the differences $(p_i - q_i)$. However this has not been yet done. Nevertheless we shall use the results exposed in Part II of the joint paper already referred to combining them with Theorem V and shall give some examples of testing hypotheses, which may be of interest.

It is easy to see that the solution of any given problem of testing hypotheses concerning the values $\bar{\theta}_i$ of some functions θ_i ($i = 1, 2, \dots, s$), will now consist in finding the minimum of the expression

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i}$$

under the assumption that the sums of linear terms in θ 's have the values $\bar{\theta}_i$ respectively. The application of Theorem V will then provide the approximate value of the likelihood of the hypothesis and the application of the theorems exposed in the Appendix to the joint paper referred to, will give the probability of rejecting a true hypothesis.

Now, when proving Theorem III, it has been shown that the solution of the minimum problem concerning the above expression χ^2 is always possible to carry out and is given by the formula (114). So the possibility of testing a composite hypothesis depends upon the possibility of expressing it, ascribing some definite values to a certain number of functions θ_i as described above. We see there-

fore that the class of hypotheses possible to test by method of likelihood is considerably increased, as the formerly applied method, based on finding the minimum of

$$N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{p_i}$$

could be followed only in exceptional cases. Of course the application of both methods is possible only when the obtained sample is big enough.

IV. The Application of Previous Results to Testing of Some Composite Hypotheses

10. The hypothesis concerning the mean and the variance.

Suppose that the grouping of the population and the sample corresponds to different values of a character, say X , of their individuals, say

$$x_1, x_2, x_3 \dots x_k \tag{178}$$

Assume further that the x 's are measured from their mean in the sample and thus that

$$\sum_{i=1}^k q_i x_i = 0 \tag{179}$$

Denote by S^2 and μ_i the variance and the i -th moment in the sample about its mean.

We shall consider the composite hypothesis H that the deviations of the mean, a , and of the variance, σ^2 , of the population from their sample values, measured in terms of $\frac{1}{\sqrt{N}}$ have certain definite values. Call these deviations θ_1 and θ_2 respectively and their hypothetical values

$$\theta_1 = \bar{\theta}_1 = \sqrt{N} a, \quad \theta_2 = \bar{\theta}_2 = (\sigma^2 - S^2) \sqrt{N} \tag{180}$$

We shall have

$$\theta_1 = V\bar{N} \sum_{i=1}^k x_i (p_i - q_i) \tag{181}$$

$$\theta_2 = V\bar{N} \left\{ \sum_{i=1}^k x_i^2 (p_i - q_i) - \left[\sum_{i=1}^k x_i (p_i - q_i) \right]^2 \right\}$$

According to the Theorem V the likelihood of the hypothesis H tends $e^{-\frac{1}{2}\chi^2}$ as $N \rightarrow \infty$ where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} \tag{182}$$

calculated under the conditions that

$$\sum_{i=1}^k (p_i - q_i) = 0$$

$$V\bar{N} \sum_{i=1}^k x_i (p_i - q_i) = \bar{\theta}_1 \tag{183}$$

$$V\bar{N} \sum_{i=1}^k x_i^2 (p_i - q_i) = \bar{\theta}_2$$

According to the results exposed in our Part II, the probability of rejecting a true hypothesis is less than the difference

$$1 - \int_0^{\chi_1} \chi e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi = \int_{\chi_1}^{\infty} \chi e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi = e^{-\frac{1}{2}\chi_1^2} \tag{184}$$

To find χ_1^2 we differentiate the function

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i} - \alpha \sum_{i=1}^k (p_i - q_i) - \beta \sum_{i=1}^k x_i (p_i - q_i) - \gamma \sum_{i=1}^k x_i^2 (p_i - q_i) \tag{185}$$

with regard to p_i and put the derivatives to zero. We have

$$\frac{p_i - q_i}{q_i} = \alpha + \beta x_i + \gamma x_i^2 \tag{186}$$

$$p_i - q_i = q_i (\alpha + \beta x_i + \gamma x_i^2) \tag{187}$$

Multiplying (187) into $x_i^0, x_i,$ and $x_i^2,$ and summing for $i = 1, 2, \dots, k,$ we have

$$\begin{aligned} \alpha + \gamma S^2 &= 0 \\ \beta S^2 + \gamma \mu_3 &= a \\ \alpha S^2 + \beta \mu_3 + \gamma \mu_4 &= \sigma^2 - S^2 \end{aligned} \tag{188}$$

Multiplying (186) into the difference $(p_i - q_i)$ and summing we get owing to (183) and (180)

$$\chi_1^2 = N(\beta a + \gamma(\sigma^2 - S^2)) \tag{189}$$

Solving the equations (188) with regard to β and γ and substituting into (189) we have finally

$$\begin{aligned} \chi_1^2 &= N \frac{S^2(\beta_2 - 1) a^2 - 2\sqrt{\beta_1} S a (\sigma^2 - S^2) + (\sigma^2 - S^2)^2}{S^4(\beta_2 - \beta_1 - 1)} = \\ &= \frac{S^2(\beta_2 - 1) \bar{\theta}_1^2 - 2\sqrt{\beta_1} S \bar{\theta}_1 \bar{\theta}_2 + \bar{\theta}_2^2}{S^4(\beta_2 - \beta_1 - 1)} \end{aligned} \tag{190}$$

where β_1 and β_2 are the very well known Pearson's parameters. The formula (190) is remarkable as it shows that the limiting *a posteriori* probability law of population mean and population variance is a normal one with constants equal to these given long ago by K. Pearson for the distribution of means and variances in repeated samples.

11. The hypothesis concerning two means.

As a second example we shall consider the hypothesis concerning means of two different characters, X and $Y,$ in a bivariate population. Suppose that the groups of the population form a correlation table with n columns corresponding to different values of the character $X,$ say

$$x_1, x_2, \dots, x_n \tag{191}$$

and with m rows corresponding to different values of the character $Y,$ say

$$y_1, y_2, \dots, y_m \tag{192}$$

The origin of the coordinates here and everywhere below will be in respective means of the two considered characters in the sample. Denote by p_{ik} and q_{ik} the group proportions in the population and in the sample respectively, corresponding to $X = x_i$ and $Y = y_k$

and write S_x^2 and S_y^2 for the variances of X and Y in the sample. r will be the coefficient of correlation in the sample

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m x_i y_k q_{ik}}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{k=1}^m q_{ik}\right) \left(\sum_{k=1}^m y_k^2 \sum_{i=1}^n p_{ik}\right)}} \quad (193)$$

Let

$$\begin{aligned} \theta_1 &= \sqrt{N} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{k=1}^m (p_{ik} - q_{ik}) \\ \theta_2 &= \sqrt{N} \sum_{k=1}^m y_k \sum_{i=1}^n (p_{ik} - q_{ik}) \end{aligned} \quad (194)$$

We shall test the hypothesis H that θ_1 and θ_2 — the deviations of population means of X and Y from their sample values, measured in terms of $\frac{1}{\sqrt{N}}$ have some definite values, say

$$\theta_1 = \sqrt{N} x_0 = \bar{\theta}_1, \quad \theta_2 = \sqrt{N} y_0 = \bar{\theta}_2 \quad (195)$$

As above, the likelihood of that hypothesis and the probability of rejecting a true hypothesis will be estimated by the same number,

$$e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} \quad (196)$$

where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m \frac{(p_{ik} - q_{ik})^2}{q_{ik}} \quad (197)$$

calculated under the conditions that

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m (p_{ik} - q_{ik}) &= 0 \\ \sqrt{N} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{k=1}^m (p_{ik} - q_{ik}) &= \bar{\theta}_1 \\ \sqrt{N} \sum_{k=1}^m y_k \sum_{i=1}^n (p_{ik} - q_{ik}) &= \bar{\theta}_2 \end{aligned} \quad (198)$$

To find χ_1^2 we differentiate the function

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m \frac{(p_{ik} - q_{ik})^2}{q_{ik}} - \alpha \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m (p_{ik} - q_{ik}) - \\ - \beta \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m x_i (p_{ik} - q_{ik}) - \gamma \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m y_k (p_{ik} - q_{ik}) \end{aligned} \quad (199)$$

with regard to p_{ik} and put the derivatives to zero. We have

$$\frac{p_{ik} - q_{ik}}{q_{ik}} = \alpha + \beta x_i + \gamma y_k \quad (200)$$

$$p_{ik} - q_{ik} = (\alpha + \beta x_i + \gamma y_k) q_{ik} \quad (201)$$

We shall now use the conditions (198).

Multiplying (200) into $(p_{ik} - q_{ik})$ and summing we have

$$\frac{1}{N} \chi_1^2 = \beta x_0 + \gamma y_0 \quad (202)$$

Multiplying (201) into x_i and summing and then multiplying the same equation into y_k and summing we get

$$\begin{aligned} \beta S_x^2 + \gamma r S_x S_y &= x_0 \\ \beta r S_x S_y + \gamma S_y^2 &= y_0 \end{aligned} \quad (203)$$

the two equations, which give us the values of β and γ . Putting these values into (202) we find the expression of

$$\begin{aligned} \chi_1^2 &= N \frac{x_0^2 S_y^2 - 2r S_x S_y x_0 y_0 + y_0^2 S_x^2}{(1 - r^2) S_x^2 S_y^2} = \\ &= \frac{\bar{\theta}_1^2 S_y^2 - 2r S_x S_y \bar{\theta}_1 \bar{\theta}_2 + \bar{\theta}_2^2 S_x^2}{(1 - r^2) S_x^2 S_y^2} \end{aligned} \quad (204)$$

The formula (204) is a familiar one, but it is rather astonishing that it has a justification under so weak conditions.

It is a matter of very simple calculations that the likelihood of the hypothesis that the difference $\sqrt{N}(x_0 - y_0) = \sqrt{N}d$, $\sqrt{N}d$ being a definite hypothetical value, tends to

$$e^{-\frac{1}{2} \chi_1^2} \quad (205)$$

where

$$\chi_1^2 = N \frac{(d - D)^2}{S_x^2 - 2r S_x S_y + S_y^2} \quad (206)$$

D being the difference of two considered means in the sample. The probability of rejecting a true hypothesis will be estimated by

$$1 - \frac{2}{\sqrt{2\pi}} \int_0^{\chi_1^2} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi = \frac{2}{\sqrt{2\pi}} \int_{\chi_1^2}^{\infty} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \quad (207)$$

12. The hypothesis concerning the coefficient of correlation.

Let r be the coefficient of correlation

$$r = \frac{\sum_i \sum_k p_{ik} x_i y_k - (\sum_i x_i \sum_k p_{ik}) (\sum_k y_k \sum_i p_{ik})}{\sqrt{[\sum_i x_i^2 \sum_k p_{ik} - (\sum_i x_i \sum_k p_{ik})^2][\sum_k y_k^2 \sum_i p_{ik} - (\sum_k y_k \sum_i p_{ik})^2]}} \quad (208)$$

of two characters X and Y in a bivariate population grouped as described in the preceding section. Let further the sample value of r be

$$\bar{r} = \frac{\sum_i \sum_k q_{ik} x_i y_k}{S_x S_y} \quad (209)$$

It will be convenient to measure x_i and y_k in terms of respective standard deviations in the sample and thus to assume

$$S_x = 1, \quad S_y = 1 \quad (210)$$

We shall test the composite hypothesis that the deviation of r from its sample value measured in terms of $\frac{1}{\sqrt{N}}$ has a definite value, namely

$$\theta' = \sqrt{N} (r - \bar{r}) = \bar{\theta}' \quad (211)$$

The function θ' can be written in the form

$$\theta' = \sqrt{N} \left\{ \sum_i \sum_k q_{ik} x_i y_k + \sum_i \sum_k x_i y_k (p_{ik} - q_{ik}) - (\sum_i x_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik})) \times \right. \\ \left. \times (\sum_k y_k \sum_i (p_{ik} - q_{ik})) \right\} \times \left\{ 1 + \sum_i x_i^2 \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) - \right.$$

$$\begin{aligned}
 & - \left(\sum_i x_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) \right)^2 \}^{-1/2} \left\{ 1 + \sum_k y_k^2 \sum_i (p_{ik} - q_{ik}) - \right. \\
 & \left. - \left(\sum_k y_k \sum_i (p_{ik} - q_{ik}) \right)^2 \right\}^{-1/2} - V\bar{N} \sum_i \sum_k x_i y_k q_{ik} \quad (212)
 \end{aligned}$$

Denoting by θ the sum of the first order [terms in the right-hand side of (212), we shall have

$$\begin{aligned}
 \theta = V\bar{N} \left\{ \sum_i \sum_k x_i y_k (p_{ik} - q_{ik}) - \frac{1}{2} \bar{r} \left(\sum_i x_i^2 \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) + \right. \right. \\
 \left. \left. + \sum_k y_k^2 \sum_i (p_{ik} - q_{ik}) \right) \right\} \quad (213)
 \end{aligned}$$

Thus the likelihood of the hypothesis under consideration will tend to $e^{-\frac{1}{2}\chi_1^2}$ as $N \rightarrow \infty$ and the probability of rejecting a true hypothesis will be less than

$$\frac{2}{V2\pi} \int_{\chi_1}^{\infty} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \quad (214)$$

where χ_1^2 is the minimum value of

$$\chi^2 = N \sum_i \sum_k \frac{(p_{ik} - q_{ik})^2}{q_{ik}} \quad (215)$$

calculated under the conditions that θ has the value $\bar{\theta}$. To find χ_1^2 we differentiate the function

$$\frac{1}{2} \sum_i \sum_k \frac{(p_{ik} - q_{ik})^2}{q_{ik}} - \alpha \sum_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) - \beta \theta \quad (216)$$

with regard to p_{ik} . Equating the derivatives to zero we have

$$\frac{p_{ik} - q_{ik}}{q_{ik}} = \alpha + \beta \left\{ x_i y_k - \frac{1}{2} \bar{r} (x_i^2 + y_k^2) \right\} \quad (217)$$

As it has been done in preceding examples we easily find

$$\chi_1^2 = V\bar{N} \beta \bar{\theta}' \quad (218)$$

Multiplying (217) into q_{ik} and summing and multiplying (217) into

$$q_{ik} \left\{ x_i y_k - \frac{1}{2} \bar{r} (x_i^2 + y_k^2) \right\} \quad (219)$$

and summing again, we find

$$\alpha = 0$$

$$\beta \sum_i \sum_k \{ x_i^2 y_k^2 - \bar{r} (x_i^3 y_k + y_k^3 x_i) + \frac{1}{4} \bar{r}^2 (\bar{x}_i^4 + 2x_i^2 y_k^2 + y_k^4) \} q_{ik} = \frac{\bar{\theta}'}{\sqrt{N}} \quad (220)$$

Denoting

$$\bar{r}_{st} = \sum_i \sum_k x_i^s y_k^t q_{ik} \quad (221)$$

we shall have finally

$$\beta = \bar{\theta}' \{ \sqrt{N} [\bar{r}_{22} - \bar{r}_{11} (\bar{r}_{31} + \bar{r}_{13}) + \frac{1}{4} \bar{r}_{11}^2 (\bar{r}_{40} + 2\bar{r}_{22} + \bar{r}_{04})] \}^{-1} \quad (222)$$

The expression of χ_1^2 will be

$$\chi_1^2 = \frac{\bar{\theta}'^2}{\bar{r}_{22} - \bar{r}_{11} (\bar{r}_{31} + \bar{r}_{13}) + \frac{1}{4} \bar{r}_{11}^2 (\bar{r}_{40} + 2\bar{r}_{22} + \bar{r}_{04})} \quad (223)$$

13. The hypothesis concerning the coefficient of regression.

The last problem we shall consider consists in testing the hypothesis that θ' — the deviation of the coefficient of regression

$$\rho = \frac{\sum_i \sum_k x_i y_k p_{ik} - (\sum_i x_i \sum_k p_{ik}) (\sum_k y_k \sum_i p_{ik})}{\sum_i x_i^2 \sum_k p_{ik} - (\sum_i x_i \sum_k p_{ik})^2} \quad (224)$$

from its sample value

$$\bar{\rho} = \frac{\sum_i \sum_k x_i y_k q_{ik}}{S_x^2} \quad (225)$$

measured in terms of $\frac{1}{\sqrt{N}}$ has a definite value, say $\bar{\theta}'$. Using the notations of the preceding section with the exception that the x 's and y 's will be measured in original units and not in terms of their S. D., we shall have

$$\theta' = \frac{\sqrt{N}}{S_x^2} \left\{ \sum_i \sum_k x_i y_k q_{ik} + \sum_i \sum_k x_i y_k (p_{ik} - q_{ik}) - \left(\sum_i x_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) \right) \times \right. \\ \left. \times \left(\sum_k y_k \sum_i (p_{ik} - q_{ik}) \right) \right\} \left\{ 1 + \frac{\sum_i x_i^2 \sum_k (p_{ik} - q_{ik})}{S_x^2} - \frac{(\sum_i x_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik}))^2}{S_x^2} \right\}^{-1} - \\ - \sqrt{N} \frac{\sum_i \sum_k x_i y_k q_{ik}}{S_x^2} \quad (226)$$

Denoting again by θ the sum of first order terms in the right-hand side of this equation we shall have

$$\theta = \frac{\sqrt{N}}{S_x^2} \left\{ \sum_i \sum_k x_i y_k (p_{ik} - q_{ik}) - \bar{\rho} \sum_i x_i^2 \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) \right\} \quad (227)$$

Thus the likelihood of the hypothesis considered will tend to $e^{-\frac{1}{2}\chi_1^2}$ as $N \rightarrow \infty$, where χ_1^2 is the minimum value of χ^2 calculated under the condition that $\bar{\theta} = \bar{\theta}'$. Proceeding as usual we differentiate the function

$$\frac{1}{2} \sum_i \sum_k \frac{(p_{ik} - q_{ik})^2}{q_{ik}} - \alpha \sum_i \sum_k (p_{ik} - q_{ik}) - \frac{S_x^2 \beta \theta}{\sqrt{N}} \quad (228)$$

and put the derivatives to zero. We have

$$\frac{p_{ik} - q_{ik}}{q_{ik}} = \alpha + \beta \{x_i y^k - \bar{\rho} x_i^2\} \quad (229)$$

from which we easily get

$$\begin{aligned} \alpha &= 0 \\ \beta &= \frac{\bar{\theta}'}{\sqrt{N}} \frac{1}{r_{22} S_y^2 - 2\bar{\rho} r_{81} S_x S_y + \bar{\rho}^2 r_{40} S_x^2} \\ &= \frac{\bar{\theta}'}{\sqrt{N} S_y^2 (r_{22} - 2\bar{r}_{11} \bar{r}_{81} + \bar{r}_{11}^2 \bar{r}_{40})} \\ \chi_1^2 &= \frac{S_x^2}{S_y^2} \frac{\bar{\theta}'^2}{r_{22} - 2\bar{r}_{11} \bar{r}_{81} + \bar{r}_{11}^2 \bar{r}_{40}} \end{aligned} \quad (230)$$

The probability of rejecting a true hypothesis will be estimated by the integral

$$\frac{2}{\sqrt{2\pi}} \int_{\chi_1}^{\infty} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi \quad (231)$$

Résumé

CONTRIBUTION À LA THÉORIE DES VRAISEMBLANCES DES HYPOTHÈSES

par Dr. J. Neyman (Varsovie).

Dans le mémoire de J. Neyman et E. S. Pearson¹ ont été publiés les principes pour juger si une hypothèse statistique peut être admise ou non.

En de tels jugements on peut commettre des erreurs de deux sortes: 1) rejeter une hypothèse vraie 2) admettre une hypothèse fausse. Les principes proposés dans le travail cité donnent certains moyens pour contrôler les deux sources d'erreurs.

On s'occupe d'abord des erreurs de la deuxième catégorie. Pour les éviter on calcule ce qu'on appelle la vraisemblance de l'hypothèse (likelihood) qu'on denote par λ . Soit H une hypothèse donnée et λ_0 — sa vraisemblance. Si la vraisemblance λ_0 a été jugé petite on a tendance à rejeter l'hypothèse. Pour contrôler les erreurs de la première sorte on détermine la probabilité P pour qu'en rejetant une hypothèse ayant $\lambda \leq \lambda_0$, on rejette une hypothèse vraie. Si les deux nombres λ_0 et P ont été jugé petits, on rejette l'hypothèse H et inversement.

Dans le même mémoire il est démontré que la probabilité P peut être déterminé par une intégrale J introduite par K. Pearson² et R. A. Fisher³. Les raisonnements qui conduisent à cette conclusion sont tout-à-fait indépendants de la théorie des probabilités *a posteriori*.

Dans le présent mémoire je démontre que quelle que soit la loi des probabilités *a priori* (sauf qu'elle soit positive et continue en un

¹ J. Neyman and E. S. Pearson: On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference. *Biometrika* Vol. XX-A, Pp 175-240 et 263-294.

² K. Pearson. *Phil. Mag.* July 1900.

³ R. A. Fisher: *Journ Roy. Stat. Soc* LXXXV et LXXXVII.

seul point), la probabilité *a posteriori* d'une hypothèse ayant la vraisemblance $\lambda \leq \lambda_0$ tend vers une limite *I* lorsque le nombre des observations augmente. Le point intéressant est que *I* est aussi la limite de *J* et que, par conséquent, si le nombre des observations est très grand, les deux méthodes aboutissent à des résultats pratiquement identiques.

Les théorèmes IV et V concernent la limite de la vraisemblance. Si l'on convient de mesurer la vraisemblance avec la valeur de sa limite, la méthode proposée pourrait être appliquée à un large groupe de problèmes qui ne pouvaient être traités auparavant à cause des difficultés techniques qu'on rencontrait en résolvant les équations qui y intervenaient.

Le mémoire se termine par quelques exemples de l'application de la méthode, aux hypothèses concernant 1) la moyenne arithmétique et le carré de l'écart moyen quadratique 2) les deux moyennes arithmétiques 3) le coefficient de corrélation et 4) le coefficient de régression.

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego].

M. Laskowski.

O pobieraniu tlenu przez skórę u żaby.

Über die Sauerstoffaufnahme durch die Haut beim Frosche.

Rękopis nadesłany w dniu 1. IX. 1929 r.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war die Faktoren der Hautatmung in der Luft und im Wasser zu vergleichen und den spezifischen Einfluss des Wassermilieu's auf die Sauerstoffaufnahme zu ermitteln.

Um individuelle Schwankungen zu vermeiden, wurden alle vergleichende Messungen an ein und demselben Frosch ausgeführt.

Der Verfasser trachtete zunächst zu entscheiden, ob unter gleichen Bedingungen (Temperatur, Sauerstoffdruck) die Intensität der Sauerstoffaufnahme im Wasser und in der Luft verschieden ist. Die diesbezüglichen bis jetzt von BOHR ('00) und KROGH ('04) — zwar an einem, wie es scheint ungenügenden Material ausgeführten — Untersuchungen haben diese Autoren zu zwei, einander widersprechenden Folgerungen veranlasst. Der Verfasser der vorliegenden Arbeit führte seine Versuche in der Weise aus, dass er die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut, nach Ausschaltung der Lungenatmung, ebensowohl im Wasser, wie auch in der Luft prüfte. Die Versuche im Wasser wurden in einem Respirationsapparate — bei durchfliessendem Wasser — vorgenommen (Fig. 1). Das Prinzip dieses Apparates ist demjenigen von EGE und KROGH ('14) ähnlich. Der Sauerstoffgehalt des Wassers wurde nach der Methode von WINKLER bestimmt. Die Intensität der Sauerstoffaufnahme in der Luft wurde in dem in Fig. 2 abgebildeten Apparate gemessen. Auf Grund der in Tab. 1 angegebenen Resultate der Versuche glaubt sich der Verfasser zu der Folgerung berechtigt, dass Frösche mit ausgeschalteter Lungenatmung bei etwa 160 mm Hg Sauerstoffpartialdruck,

sowohl in der Luft, als auch im Wasser gleiche Mengen von Sauerstoff aufnehmen.

Der Verfasser untersuchte ebenfalls den Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes auf die Sauerstoffaufnahme. Die Intensität der Sauerstoffaufnahme im Wasser wurde bei 80—250 mm Hg Sauerstoffpartialdruck gemessen. Wie aus Tab. II, III, IV und V, Fig. 3 und 4 ersichtlich, ist die Intensität der Sauerstoffaufnahme dem Sauerstoffdrucke proportional.

Es wurde ferner der Einfluss der Temperatur auf die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut untersucht. Die Sauerstoffaufnahme wurde bei 4°, 14° und 24°, jedesmal bei ein- und demselben Individuum, stets bei 160 mm Hg Sauerstoffpartialdruck und in den beiden Milieux: in der Luft (Tab. VI) und im Wasser (Tab. VII) gemessen. Der durch Steigerung der Temperatur um 10° hervorgerufene Zuwachs der Sauerstoffaufnahme durch die Haut ist von der Höhe der Temperatur unabhängig und in den beiden Milieux ungefähr gleich: $Q_{10} = 1.6$. Der scheinbare Widerspruch mit den diesbezüglichen Resultaten PÜTTER'S ('14, '17) lässt sich dadurch erklären, dass, im Gegensatz zu dem genannten Autor, in der vorliegenden Arbeit die Sauerstoffaufnahme als Funktion einer einzigen Veränderlichen (Temperatur, oder Sauerstoffpartialdruck) untersucht wurde. Der vom Verfasser festgestellte Koeffizient ($Q_{10} = 1.6$) ist somit kleiner als derjenige, der für die gleichzeitige Lungen- und Hautatmung bestimmt wurde ($Q_{10} > 2$, KROGH '14), grösser dagegen als der von KROGH ('19) für die Sauerstoffdiffusion bei isolierten Geweben ermittelte Koeffizient ($Q_{10} = 1.1$). Der Verfasser schliesst daraus, dass ausser Veränderungen der Diffusionsgeschwindigkeit, auch noch spezifische Regulationen der Sauerstoffaufnahme durch die Haut bei Temperaturwechsel angenommen werden dürfen.

Der Verfasser vergleicht ferner die Kurve des Zuwachses der Sauerstoffaufnahme durch die Haut bei Temperatursteigerung mit der analogen von KROGH ('14) bei normal (Lunge und Haut) atmenden Fröschen aufgezeichneten Kurve. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, steigt die erstere Kurve weniger steil. Daraus schliesst der Verfasser, dass der Anteil der Haut in der Gesamtsauerstoffaufnahme mit Steigerung der Temperatur abnimmt.

Zwecks Feststellung der ev. Nachwirkung des Aufenthaltes in einem Milieu wurden Frösche von der Luft ins Wasser und

vice versa übertragen. Bei Überführung normaler Frösche aus der Luft ins Wasser blieb die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut, ganz ungeachtet der langen Dauer des Versuches, (bis 24 Stunden) unverändert (Tab. VIII und IX). Die geringen Schwankungen, in den Zahlen, welche aus den Tabellen ersichtlich sind, treten auch bei kurzdauernden Versuchen, die ganz exact ausgeführt werden konnten, auf (Tab. X). Wenn hingegen ein normales Tier, welches eine Zeitlang im Wasser verblieb, dann in die Luft übertragen wurde, wo es sowohl durch die Haut als durch die Lungen atmen konnte, liess sich zuerst eine Steigerung, und nach Erreichung eines Maximums, ein Abstieg der Kurve (bis zu einem gewissen Niveau) feststellen (Tab. XI, Fig. 6).

Die im ersten Zeitabschnitte direkt nach Übertragung des Frosches aus dem Wasser in die Luft auftretende Steigerung der Sauerstoffaufnahme erklärt sich durch eine intensivere Lungenatmung, da ja die Hautatmung, wie vorher (Tab. I) erwähnt, keine Änderung bei Wechsel des Milieu erfährt. Der plötzliche Anstieg der Kurve der Sauerstoffaufnahme nach Übertragung des Tieres an die Luft weist auf Sauerstoffmangel, den es im Wasser gelitten hat.

Zwecks Bestimmung dieses Mangels und seiner Abhängigkeit von der Temperatur, prüfte der Verfasser die Luft aus der Lunge eines im Wasser befindlichen Frosches. Auf Grund dieser Versuche konnte festgestellt werden, dass der Sauerstoffgehalt in der Lunge bis unter 1% sinkt, und ferner, dass dieser minimale Sauerstoffgehalt von der Temperatur nicht beeinflusst wird (Tab. XIII). Die Geschwindigkeit, mit welcher der Prozentgehalt des Sauerstoffes in der Lungenluft fällt, ist dagegen durch die Temperatur beeinflusst; bei 14° ist diese Geschwindigkeit 3.5 mal grösser als bei 4° (Tab. XII, Fig. 7).

In Übereinstimmung mit DOLK und POSTMA ('27) wurde beobachtet, dass der Gehalt an CO₂ in der Lungenluft von 0.8 bis zu 1.7% beträgt und weder von der Temperatur, noch von der Dauer des Aufenthaltes des betreffenden Tieres im Wasser abhängt.

Istnienie oddychania skórniego u żaby pierwszy wykazał SPALLANZANI. Późniejsze doświadczenia W. EDWARDSA ('824) potwierdziły ten fakt.

W dalszym ciągu nasunęło się pytanie, jaka część całej wymiany gazowej przypada na oddychanie skórne. REGNAULT i REISET ('49), BERG ('68) i KLUG ('84)¹⁾ starali się zbadać to zagadnienie ilościowo, wyniki jednak otrzymane przez tych autorów różniły się od siebie znacznie.

BOHR ('00) pierwszy zwrócił uwagę na jakościową różnicę, istniejącą pomiędzy oddychaniem płucnym i skórnym. Stwierdził on, że po usunięciu płuc iloraz oddechowy wzrasta i przekracza jedność. Usunięcie więc płuc powoduje większe zmiany w ilości pobieranego tlenu, niż w ilości wydzielanego CO₂.

Wyczerpujące badania KROGHA ('04) wyświetliły rolę, jaką odgrywa oddychanie skórne w całkowitej wymianie gazowej zwierzęcia. KROGH pierwszy zwrócił uwagę na zmiany, jakie zachodzą w natężeniu oddychania w zależności od pory roku, i stwierdził, że intensywność pobierania tlenu przez skórę jest w ciągu całego roku stała i że zwierzę wydziela znacznie więcej CO₂ przez skórę, niż przez płuca. Jako główny wniosek swojej pracy autor ten podaje, że oddychanie skórne jest niezależne od bezpośredniego wpływu systemu nerwowego i dokonywa się wyłącznie na podstawie praw fizycznych (dyfuzja).

Wyniki KROGH'A, dotyczące wpływu pory roku na pobieranie tlenu potwierdzili ostatnio DOLK i POSTMA ('27).

We wszystkich powyższych pracach bardzo mało miejsca poświęcano analizie warunków oddychania skórniego. Wszystkie dane, dotyczące tego zagadnienia, są to najczęściej fragmentaryczne doświadczenia, wiążące się tylko pośrednio z głównymi zadaniami pracy. Wyniki, bezpośrednio odnoszące się do interesującego nas zagadnienia, dadzą się streścić w sposób następujący.

DISSARD ('93) badał wpływ wilgotności środowiska zewnętrznego na oddychanie żaby. Autor przytacza tylko jedno doświadczenie, w którym—po usunięciu oddychania płucnego przez przewiązanie tętnicy płucnej—badał wydzielanie CO₂ przez skórę w wodzie oraz w powietrzu wilgotnym i suchem. W doświadczeniu tem żaba wydzielała w wodzie 0.0605 g CO₂ na kg/godz., w powietrzu wilgotnym 0.051 g, w powietrzu suchem 0.049 g. Autor na podstawie tego jednego doświadczenia dochodzi do wniosku, że zwiększenie wilgotności środowiska otaczającego powoduje zwiększenie ilości wydzielanego przez skórę CO₂.

¹⁾ Ograniczam się do podania tylko ważniejszych prac dla wykazania rozwoju zagadnienia. Literatura została wyczerpująco omówiona przez WINTERSTEINA ('21).

BOHR ('00) i KROGH ('04) badali natężenie pobierania tlenu przez skórę w środowisku powietrznym i wodnym. BOHR znalazł, że przy jednoczesnym oddychaniu płucami i skórą żaby pobierały 141.1 cm³ O₂ na kg/godz. Natomiast w przypadku oddychania skórniego w wodzie zużycie wynosiło 134.4 cm O₂ na kg/godz. W innych doświadczeniach, w których usuwano płuca i badano oddychanie skórne w powietrzu, BOHR znajdował liczby znacznie mniejsze. Stąd wynikałoby, że natężenie pobierania tlenu przez skórę jest większe w wodzie, niż w powietrzu.

KROGH ('04) wykonał trzy doświadczenia na pojedynczych żabach, które znajdowały się w słojach z wodą. Tlen oznaczał w gazie wypompowanym przy pomocy pompy rtęciowej. Autor ten stwierdził, że ilość tlenu pobieranego przez skórę w wodzie jest znacznie mniejsza, niż ilość tlenu pobieranego przez skórę i płuca w powietrzu. Posługując się wynikami, otrzymanymi na różnych osobnikach, przekonał się on, że znalezione wartości pobierania tlenu przez skórę w wodzie wahają się w granicach znalezionych dla pobierania tlenu przez skórę w powietrzu. KROGH przyszedł więc do wniosku, że natężenie pobierania tlenu przez skórę w powietrzu i w wodzie jest jednakowe. Wniosek ten jest sprzeczny z wnioskiem BOHRA.

KROGH ('04) wykonał również jedno doświadczenie, w którym badał wpływ temperatury na wydzielanie CO₂ przez płuca i przez skórę. Z doświadczenia tego wynika, że wraz z obniżeniem się temperatury ilość CO₂ wydalanego przez płuca zmniejsza się bardziej, niż ilość CO₂ wydalanego przez skórę.

PÜTTER ('14, '17) zajmował się badaniem wpływu ciśnienia cząstkowego tlenu oraz temperatury na zużycie tlenu przez żabę, oddychającą tylko skórą. Na podstawie swoich doświadczeń, w których mierzył zawartość tlenu w wodzie metodą WINKLERA, PÜTTER wywnioskował, że zależność pomiędzy zużyciem tlenu a ciśnieniem cząstkowym tlenu, panującym w środowisku zewnętrznym, posiada charakter funkcji wykładniczej.

Wpływ temperatury na zużycie tlenu pobranego przez skórę wyraża się według PÜTTERA w tem, że zużycie tlenu zwiększa się 2¹/₂ razy wraz z podniesieniem się temperatury o 10°.

W pracy DOLKA i POSTMY ('27) znajdujemy również dwa doświadczenia, które miały na celu wyjaśnienie wpływu ciśnienia cząstkowego tlenu w powietrzu na pobieranie tego gazu przez skórę przy zachowaniu oddychania płucnego. Autorowie ci stwierdzili, że zmniejszenie zawartości tlenu w powietrzu z 20.9% na 13.8% powoduje zmniejszenie się ilości pobieranego przez skórę tlenu z 56 cm³ na 44 cm³ na kg/godz.

Jak widzimy, dane bezpośrednio odnoszące się do kwestji wpływu warunków zewnętrznych na oddychanie skórne żaby są naogół dosyć skąpe; ponadto w wielu przypadkach są one sprzeczne, wreszcie — niezawsze metodycznie poprawne.

W pracy niniejszej zająłem się wyłącznie sprawą pobierania tlenu przez skórę u żaby, dążąc do wyjaśnienia wpływu czynników zewnętrznych i wewnętrznych na przebieg tego zjawiska.

W tym celu przeprowadziłem przedewszystkiem doświadczenia, które miały rozstrzygnąć, czy środowisko (powietrzne lub wodne) wywiera wpływ na intensywność pobierania tlenu przez powierzchnię ciała zwierzęcia — zagadnienie nie pozbawione ogólnie-ekologicznego znaczenia; następnie chodziło mi o ustalenie zależności między zmianami ciśnienia cząstkowego tlenu, rozpuszczonego w wodzie, oraz zmianami temperatury środowiska zewnętrznego z jednej strony, a natężeniem pobierania tlenu przez skórę — z drugiej, i wreszcie zależało mi na wyświetleniu, czy w warunkach uniemożliwionego oddychania płucnego występują w organizmie zmiany, które mogłyby normować natężenie pobierania tlenu przez skórę.

Metodyka.

Natężenie pobierania tlenu przez skórę mierzyłem u żab, którym uniemożliwiałem oddychanie płucne. W ciągu doświadczenia starałem się zachować wszystkie warunki zewnętrzne bez zmian, zmieniając tylko ten czynnik, którego wpływ badałem. Większość doświadczeń wykonałem na żabach wodnych *Rana esculenta* L. Dla kontroli przeprowadziłem niektóre doświadczenia na żabach lądowych *Rana temporaria* L. Doświadczenia były wykonywane w środowiskach wodnym lub powietrznym.

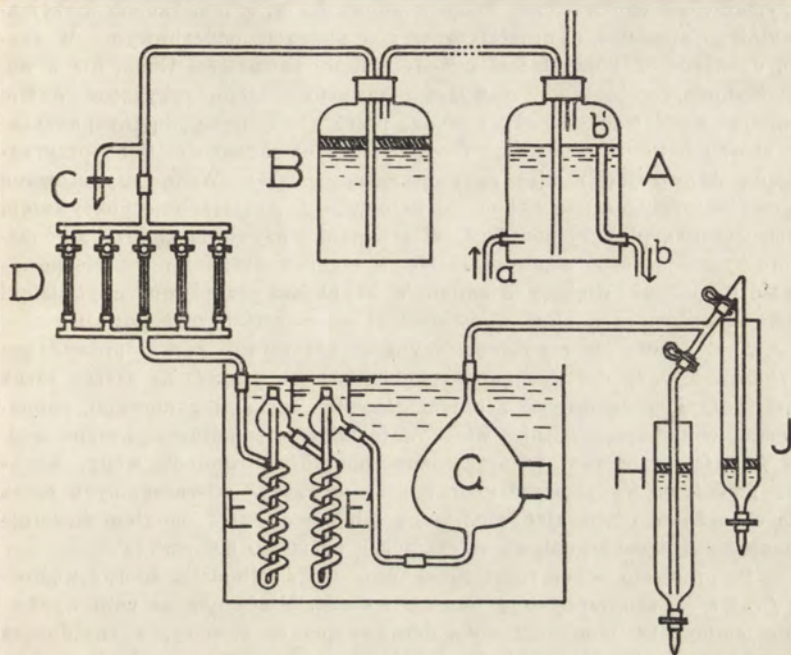
A. Doświadczenia w środowisku wodnym.

Ten typ doświadczeń nie wymagał zabiegów operacyjnych, gdyż samo zanurzenie zwierzęcia w wodzie uniemożliwiało oddychanie płucne. W celu utrzymania stałej temperatury naczynie, w którym mieściło się zwierzę, było zanurzone w dużym basenie z wodą pojemności przeszło 40 litrów, w którym znajdował się termometr z podziałką co 0.1° C. Temperaturę w basenie zmieniałem w miarę potrzeby, dodając ciepłej wody lub lodu. Dzięki dużej masie wody w basenie, temperatura jej, po doprowadzeniu do wymaganej wysokości, nie zmieniała się więcej, niż o 0.5° w ciągu pół godziny. Doświadczenia były wykonywane w temperaturach od 4° do 24°. Utrzymywałem potrzebną wysokość temperatury, dodając ciepłą wodę lub lód w odstępach piętnastominutowych.

Możliwie stałe ciśnienie cząstkowe tlenu w otoczeniu zwierzęcia starałem się osiągnąć przez umieszczenie zwierzęcia w komorze oddechowej, przez którą przepływał stały prąd wody o możliwie jednakowej zawartości tlenu. W celu obliczenia pobranego przez zwierzę tlenu oznaczałem zawartość tlenu w wodzie dopływającej i wypływającej oraz mierzyłem ilość wody, która w jednostce czasu przepływała przez aparat.

Aparat oddechowy wodny, używany przeze mnie, był zbliżony do aparatu, opisanego przez EGEKO i KROGHA (14). Właściwa komora odde-

chowa *G* (rys. 1) miała kształt czaszy, pokrytej stożkiem. W najniższym punkcie czaszy oraz w wierzchołku stożka były wtopione rurki: doprowadzająca (dolna) i wyprowadzająca wodę (górną). W jednym z boków komory znajdowała się boczna szyjka, zamykana korkiem gumowym. Przez otwór szyjki wprowadzałem i wyjmowałem zwierzę. Pojemność komory wynosiła 339 cm³.



Rys. 1. Aparat oddechowy wodny. A — zbiornik wody dopływającej o stałym poziomie wody, B — zbiornik wody dopływającej, zabezpieczonej parafiną ciekłą, C — rurka do pobierania próbek wody dopływającej, D — rurki włoskowate regulujące szybkość przepływu wody, E i E' — węzownice, F i F' — bezpieczniki służące do zatrzymywania pęcherzyków gazu, G — komora oddechowa, H i J — odbieralniki.

Fig. 1. Wasserrespirationsapparat. A — Behälter für das zufließende Wasser, welcher ein konstantes Niveau versichert, B — Behälter für das zufließende, mit Paraffinöl verschützte Wasser, C — Röhre zum Entnehmen der Proben vom zufließenden Wasser, D — Kapillarröhrchen zur Regulierung der Wasserleitungsgeschwindigkeit, E und E' — Spiralen, F und F' — Sicherheitsventile, G — Respirationskammer, H und J — Rezipienten für das abfließende Wasser.

Wodę, wypływającą z komory, zbierałem kolejno do jednego z dwu odbieralników *H* i *J*, o pojemności po 750 cm³ każdy. Odbieralniki te w kształcie cylindrów były zaopatrzone w podziałkę, pozwalającą odczytać ilość zebranej w nich wody z dokładnością do 3 cm³. W każdym z cylindrów zbierałem wodę w ciągu 15 minut, w wyjątkowych przypadkach — w ciągu 30 minut. Woda w czasie zbierania się w odbieralniku była stale pokryta

grubą warstwą parafiny płynnej, która, jak wiemy (KUBIE²⁷), jest trudno przepuszczalna dla gazów.

Jako zbiorników wody dopływającej używałem dużych flaszek pojemności około 10 litrów. Jeśli doświadczenie wykonywałem, przepuszczając przez aparat wodę wodociągową, posługiwałem się zbiornikiem *A*, do którego woda dopływała przez rurkę *a*. Rurka odpływowa *bb'* miała na celu utrzymanie stałego poziomu wody w zbiorniku *A*, a tem samym utrzymanie stałego ciśnienia hydrostatycznego w aparacie oddechowym. W szeregu doświadczeń korzystałem z wody o innej zawartości tlenu, niż w wodzie wodociągowej. Wodę o wyższej zawartości tlenu przygotowywałem mieszając wodę wodociągową z wodą, przez którą uprzednio przepuszczalem strumień tlenu z bomby. Wodę o niższej zawartości tlenu przyrządzałem, wypędzając z niej gazy przez ogrzewanie. Wodę przygotowaną w powyższy sposób nalewałem do balonu *B* i powierzchnię pokrywałem grubą warstwą płynnej parafiny. W przypadku używania zbiornika *B* ciśnienie hydrostatyczne zmniejszało się w ciągu doświadczenia. Nie powodowało to jednak większych zmian w szybkości przepływu, gdyż dzięki wielkości zbiornika poziom wody obniżał się w nim bardzo powoli.

Ażeby dowolnie regulować szybkość przepływu, rurka, prowadząca ze zbiornika wody dopływającej, rozgałęziała się przy *D* na szereg rurek włoskowatych, połączonych z pniem głównym rurkami gumowymi, zaopatrzonemi w zaciskacze. Rurki włoskowate miały różną długość i różne średnice światła, przedstawiały więc różne opory dla strumienia wody. Szybkość przepływu wody przez aparat przy otwarciu poszczególnych rurek była oznaczona. Otwierając więc jedną lub więcej rurek, mogłem dowolnie zmieniać szybkość przepływu w granicach od 90 do 600 cm³/15'.

Po przejściu przez rurki włoskowate woda wchodziła do dwu wężownic *EF* i *EF'*, zanurzonych w basenie z wodą. Miały one na celu wyrównanie temperatur pomiędzy wodą dopływającą do komory, a znajdującą się w basenie. Bezpieczniki *F* służyły do zatrzymywania pęcherzyków gazu, które mogłyby powstać podczas ogrzewania się wody w basenie. Po przejściu przez obie spirale woda dochodziła do komory.

Próbki wody dopływającej pobierałem przez rurkę *C*, próbki zaś wody wypływającej — przez rurki dolne odbiorników *H* i *J*.

Tlen rozpuszczony w wodzie oznaczałem metodą WINKLERA. Do analizy brałem po 50 cm³ wody. Miareczkowałem 0.01 n roztworem Na₂S₂O₃, którego miano oznaczałem codzień. W ciągu doby zmieniało się ono nieznacznie.

Po rozpoczęciu doświadczenia wodę do analizy brałem najwcześniej po 45 minutach, przeciętnie dopiero po godzinie od chwili wstawienia komory do basenu, gdyż tyle czasu było potrzeba na wyrównanie się temperatur zwierzęcia i otoczenia (DOLK i POSTMA), oraz na ustalenie się zawartości tlenu w komorze.

Natężenie pobierania tlenu obliczałem z różnicy zawartości tlenu w wodzie dopływającej i wypływającej, na podstawie jednej pary liczb w tych tylko wypadkach, gdy chodziło mi o porównanie intensywności pobierania w różnych odstępach czasu. We wszystkich pozostałych do-

świadczeniach miałem conajmniej pięć par oznaczeń zawartości tlenu w wodzie i z nich obliczałem średnie natężenie pobierania. Do obliczania wartości średniej upoważniły mnie wyniki doświadczeń długotrwałych (p. wyniki), w których nie stwierdziłem żadnych kierunkowych zmian w natężeniu pobierania w zależności od czasu przebywania zwierzęcia w wodzie.

Ciśnienie cząstkowe tlenu, panujące w komorze oddechowej obliczałem ze wzoru $p = \frac{v \cdot 760}{\alpha t}$. Wartość v (ilość tlenu zawarta w litrze wody) była to średnia pomiędzy przeciętnymi oznaczeń tlenu w wodzie dopływającej i wypływającej. Wartość αt (współczynnik rozpuszczalności tlenu w wodzie) brałem z tablicy WINKLERA (Chemiker Kalender, 1927, str. 326).

B. Doświadczenia w środowisku powietrznym.

Badając natężenie pobierania tlenu przez skórę w środowisku powietrznym, usuwałem oddychanie płucne drogą zabiegów operacyjnych. Stosowałem metody następujące:

1^o. Sposób BOHRA — zasycie otworu gębowego i zatamponowanie otworów nosowych mokrą watą; ten sposób dawał mi najgorsze rezultaty, gdyż tampony dość łatwo wypadaly.

2^o. Usunięcie płuc. Operację wykonywałem zwykle prowadząc cięcia wzdłuż obu boków żaby, zaś płuca po podwiązaniu usuwałem. W innych doświadczeniach robiłem cięcia od strony grzbietowej, przecinając wyrostki poprzeczne kręgów conajmniej po dwa z każdej strony. Usunięcie płuc jest oczywiście sposobem radykalnym, jest to jednak operacja poważna, powoduje często silne krwawienia i prawdopodobnie wywołuje głębokie zmiany w organizmie.

3^o. Sposób KROGHA polegający na zatamponowaniu krtani. W tym celu używałem pałeczki szklanej, zakończonej dwiema oliwkami. Jedną z oliwek wprowadzałem do wnętrza krtani, druga pozostawała nazewnątrz, to jest w jamie gębowej. Szczelinę, pozostającą między ścianami głośni a pałeczką, zaszywałem. Sposób ten dawał dobre rezultaty, operacja zaś była prawie bezkrwawa.

Wszystkie operacje wykonywałem pod narkozą, używając w tym celu eteru lub uretanu. Do doświadczeń brałem zwierzęta już obudzone. W przypadkach, kiedy zwierzę było narkotyzowane eterem, używałem je do doświadczeń dopiero na drugi dzień po operacji.

Natężenie pobierania tlenu przez skórę w środowisku powietrznym mierzyłem w aparacie (przedstawionym na rysunku 2), zaopatrzonym u góry w manometr (G) i boczną rurkę zamykaną kranem, i posiadającym u dołu rozszerzenie A , wypełnione roztworem KOH 3-5%. Część dolna zbiornika A była oddzielona od części górnej B , w której umieszczano zwierzę, przy pomocy szklanej płytki C , gęsto podziurawionej. Szlifowany korek D zamykał górną szyjkę naczynia. W korek była wtopiona rozgałęziona rurka szklana, której jedna część prowadziła nazewnątrz, a druga — do manometru. Manometr G był wypełniony olejkim goździkowym, którego gęstość oznaczyłem piknometrem. Wynosiła ona 1.038. Objętość całego aparatu wynosiła 387.1 cm³.

Ponieważ CO_2 było chłonięte przez znajdujący się w aparacie ług, ze zmniejszenia ciśnienia powietrza w aparacie obliczałem ilość zużytego tlenu.

Zwierzę umieszczałem w przyrządzie, który następnie zanurzałem w basenie z wodą. W celu wyrównania temperatury zwierzęcia i otoczenia zamykałem przyrząd conajmniej po upływie godziny od chwili umieszczenia go w basenie.

Postępowałem inaczej tylko wtedy, gdy na tem samym zwierzęciu i w tej samej temperaturze wykonywałem dwa pomiary: pierwszy w wodzie, drugi w powietrzu. Wówczas, przed ukończeniem doświadczenia w środowisku wodnym, zanurzałem aparat powietrzny w basenie, aby doprowadzić go do potrzebnej temperatury. Po ukończeniu doświadczenia wodnego szybko przenosiłem zwierzę z komory oddechowej wodnej do aparatu powietrznego. Ponieważ zwierzę już uprzednio posiadało temperaturę wymaganą, zamykałem kran *E* po upływie 5 minut.

Stan manometru odczytywałem co 15 lub co 30 minut, z dokładnością do 0.02 mm słupa cieczy manometrycznej (olejku). Przy obliczaniu ilości pobranego przez zwierzę tlenu wprowadzałem poprawkę na temperaturę i ciśnienie barometryczne. Temperaturę odczytywałem z dokładnością do 0.02°, ciśnienie barometryczne z dokładnością do 0.01 mm Hg.

C. Badanie gazów płuc.

W celu oznaczenia zmian, zachodzących w zawartości tlenu w powietrzu płucnym żaby, przebywającej w wodzie, wprowadzałem do płuc zwierzęcia i zamykałem w nich pewną ilość powietrza, które następnie analizowałem. Operację wykonywałem metodą KROGHA, z tą tylko różnicą, że zamiast szklanej pałeczki wprowadzałem do krtani podobnego kształtu kanjule. Łącząc kanjule rurką gumową ze strzykawką, wprowadzałem odmierzoną ilość powietrza atmosferycznego do płuc, poczem rurkę gumową przewiązywałem szczelnie sznurkiem. Zwierzę operowane umieszczałem w komorze oddechowej aparatu wodnego o stałej temperaturze. Co pe-

Rys. 2. Aparat oddechowy powietrzny. A — zbiornik zawierający ług, B — właściwa komora oddechowa, C — podziurkowana szklana płytka, G — manometr.

Fig. 2. Luftrespirationsapparat. A — Behälter für Lauge, B — Eigentliche Respirationskammer, C — Durchlöchernte Glasplatte, G — Manometer mit Nelkenöl.

wien czas wyjmowałem żabę z aparatu i pobierałem próbki gazu, przekuwając strzykawką bok zwierzęcia. Analizowałem gaz w mikrotonometrze KROGHA. Robiłem conajmniej trzy równoległe oznaczenia z każdej próbki gazu.

I. Wpływ środowiska na pobieranie tlenu przez skórę.

Jak podawałem we wstępie, BOHR i KROGH, badając oddychanie skórne żaby w powietrzu i wodzie, przysłali do wręcz przeciwnych wniosków. Należy jednak podkreślić, że materiał doświadczalny obu autorów był niedostateczny. Uważałem więc, że zagadnienie nie jest ostatecznie rozwiązane i wymaga dalszych badań eksperymentalnych.

Ażebym uniknąć możliwych różnic indywidualnych, wykonywałem na jednej i tej samej żabie oba typy doświadczeń, możliwie bezpośrednio jedno po drugim. Kolejność doświadczeń nie była przestrzegana.

Tabela I zawiera wyniki wszystkich wykonanych przeze mnie doświadczeń. Tylko doświadczenia niedokończone lub wadliwe zostały pominięte. Jak widzimy z rubryki 15, w większości przypadków natężenie pobierania tlenu w wodzie nie różni się więcej niż o 30% od natężenia pobierania tlenu w powietrzu. Różnice te możemy uważać za błąd popełniony podczas wykonywania doświadczeń, gdyż jak widać z liczb, oznaczonych gwiazdką, dwa pomiary wykonane na tej samej żabie i w tym samym środowisku różnią się pomiędzy sobą: w powietrzu o 22.4%, w wodzie o 16.5%. Tylko w trzech doświadczeniach [35, 36(I), 43] natężenie pobierania tlenu w wodzie wynosi mniej, niż 70% pobierania w powietrzu.

W każdym jednak z tych trzech przypadków obniżenie natężenia pobierania tlenu w wodzie mogło być spowodowane przyczynami ubocznymi. W doświadczeniu 35 żaba została zoperowana między doświadczeniem w środowisku wodnym a powietrznym. Pomiarów w środowisku powietrznym dokonano na drugi dzień po operacji. Operacja zaś polegała na usunięciu płuc, przytem zwierzę było usypiane eterem. Doświadczenie 43 skończyło się śmiercią żaby w komorze wodnej. Wartość więc natężenia oddychania w wodzie nie może być uważana za normalną. Różnice, występujące w doświadczeniu 36(I), należy przypisać niedość dokładnemu wyeliminowaniu oddychania płucnego. Po usunięciu bowiem płuc [dośw. 36(II)] wartości pobierania tlenu w obu środowiskach u tej samej żaby różniły się tylko o 7%.

Należy jeszcze zaznaczyć, że w doświadczeniach podanych w tabeli I, ciśnienie cząstkowe tlenu w wodzie nie było zupeł-

Porównanie natężenia pobierania tlenu przez skórę w powietrzu i w wodzie.

T a b e l a I.

Vergleichende Darstellung der Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut, im Wasser und in der Luft.

Data	Gatunek zwierzęcia Tierspezies	Płeć	Ciężar Gewicht des Tieres	Temperatura basenu Temperatur im Bassin	Środowisko wodne Wasser-Milieu			Środowisko powietrzne Luft-Milieu			Uwagi Anmerkungen	
					średnia szybkość przepływu wody przez aparat oddechowy w 1 Liter Wasser	średnia ilość tlenu pobieranego przez zwierzę w wodzie	czas trwania doświadczenia	średnia ilość tlenu pobieranego przez zwierzę w powietrzu	czas trwania doświadczenia	średnia ilość tlenu pobieranego w powietrzu		natężenie pobierania tlenu w wodzie w % dobowej intensywności Sauerstoffaufnahme in der Luft
doświadczenia			g	°C	cm ³ /15'	cm ³ /15'	h	cm ³ /15'	h	cm ³ /15'	%	
32	<i>Rana temporaria</i>	♀	41.2	18	6.27	5.41	434	135	2 ¹ / ₄	0.37	123	Zasytło otwór gębowy, zatamponowano nos
33	<i>R. tempor.</i>	♀	36.0	8	7.56	6.91	300	138	2	0.20	54	Ligatura des Maules, Tamponierung der Nase
34	<i>R. esculenta</i>	♂	45.0	8	8.11	7.50	293	150	2 ¹ / ₄	0.18	62	Usunieto puca
35	<i>R. esculenta</i>	♂	45.0	15	8.05	7.24	306	167	2	0.25	93	Exsirtation der Lungen
36	<i>R. esculenta</i>	♂	78.4	14	7.72	6.99	416	160	2 ¹ / ₂	0.30	86	Ligat. d. Maules, Tamp. d. Nase
37	<i>R. esculenta</i>	♀	60.4	16.5	7.26	6.43	436	157	2	0.36	77	Usunieto puca
38	<i>R. esculenta</i>	♂	53.4	16.5	7.40	6.32	460	157	2 ¹ / ₄	0.50	91	Tampon w krtań
39	<i>R. tempor.</i>	♀	69.4	17	7.37	6.68	435	162	2 ¹ / ₄	0.30	86	Tamponierung des Larynx
40	<i>R. esculenta</i>	♀	71.1	11	7.81	7.05	301	152	2 ¹ / ₂	0.23	88	Tampon w krtań
41	<i>R. esculenta</i>	♀	49.7	11	7.33	6.77	299	147	2	0.17	65	Tamponierung des Larynx
42	<i>R. tempor.</i>	♀	45.5	25	6.01	4.45	448	140	2 ¹ / ₄	0.70	125	Tampon w krtań
43	<i>R. esculenta</i>	♀	31.7	25	6.61	5.96	448	171	2 ¹ / ₄	0.29	81	Exsirtation der Lungen
44	<i>R. esculenta</i>	♀	53.3	16	6.60	5.88	423	144	2 ¹ / ₄	0.30	94	Usunieto puca
45	<i>R. esculenta</i>	♀	52.5	16	6.68	6.09	425	145	2 ¹ / ₄	0.25	78	Tampon w krtań
46	<i>R. esculenta</i>	♂	52.5	16	6.56	5.79	432	140	2	0.33	55	Tamponierung des Larynx
47												
48												
49												

nie stałe. Stwierdzamy jednak, że wahało się ono od 135 do 171 mm Hg, t. j. w obie strony od wartości 160 mm, odpowiadającej ciśnieniu tlenu w powietrzu atmosferycznym.

Z podanych doświadczeń wnioskujemy, że żaby, którym uniemożliwiono oddychanie płucne, pobierają przez skórę w powietrzu i w wodzie, przy ciśnieniu cząstkowym O_2 , równym około 160 mm Hg, jednakowe ilości tlenu. Wniosek ten jest zgodny z wnioskiem KROGHA, w przeciwstawieniu do twierdzenia BOHRA.

Fakt ten tłumaczymy w ten sposób, że żaba w obu środowiskach pobiera tlen przez skórę nasyconą cieczą, zbliżoną — co do wartości współczynnika rozpuszczalności tlenu (jak inne ciecze żywych organizmów, np. osocze krwi) — do wody. Wobec tego żaba może pobierać z powietrza tyle tylko tlenu, ile go się może przy danym ciśnieniu rozpuścić w cieczy nasycającej skórę, a więc tyleż co w wodzie.

II. Wpływ ciśnienia cząstkowego tlenu na pobieranie tlenu przez skórę.

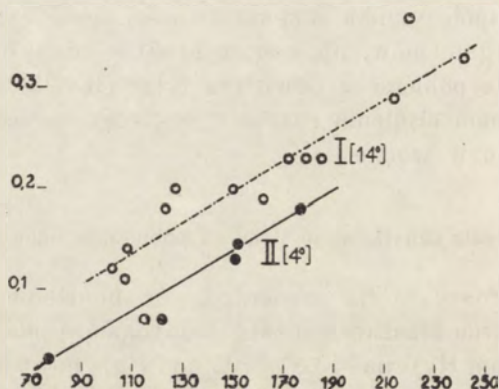
DOLK i POSTMA ('27) stwierdzili, że obniżenie zawartości tlenu w powietrzu otaczającym żabę (oddychającą płucami i skórą) z 20.9% (160 mm Hg) na 13.8% (105 mm Hg) powoduje zmniejszenie pobierania tlenu przez skórę i odpowiednie zwiększenie pobierania przez płuca, tak że suma pobranego tlenu nie ulega prawie zupełnie zmianie.

Fakt ten przypisują autorowie różnicy istniejącej w grubości błon, przez które dyfuzja się odbywa. W płucach błona, rozdzielająca środowisko zewnętrzne i wewnętrzne, jest bardzo cienka. Szybkość dyfuzji jest dzięki temu duża. Krew przepływająca przez kapilary płuc zostaje doprowadzona do stanu fizjologicznego nasycenia tlenem, zaś obniżenie się ciśnienia O_2 w płucach tak długo nie wpływa wyraźnie na pobieranie tego gazu, dopóki to ciśnienie nie opadnie poniżej ciśnienia, odpowiadającego nasyceniu krwi tlenem.

Skóra natomiast jest znacznie grubsza od nabłonka płuc. Dzięki temu szybkość dyfuzji tlenu przez skórę jest mniejsza, niż przez płuca. Krew, przepływająca przez naczynia włoskowate skórne, nie zostaje doprowadzona do stanu fizjologicznego nasycenia tlenem. Obniżenie ciśnienia w środowisku zewnętrznym będzie zmniejszało już poprzednio małą szybkość dyfuzji tlenu przez skórę, a tem samem natężenie pobierania tego gazu.

Nasunęło się więc przypuszczenie, że przy ciśnieniach tlenu w środowisku zewnętrznym niezbyt różniących się od 160 mm Hg (jak to miało miejsce w doświadczeniach DOLK i POSTMY) powinna istnieć prosta proporcjonalność pomiędzy ciśnieniem tlenu w środowisku zewnętrznym a pobieraniem tego gazu przez skórę.

W celu sprawdzenia tego przypuszczenia wykonałem szereg doświadczeń, umieszczając żabę w aparacie wodnym w stałej temperaturze i zmieniając ciśnienie cząstkowe tlenu w przepływającej przez aparat wodzie w granicach od 80 do 250 mm Hg. Pragnąc możliwie dokładnie wyizolować wpływ warunków we-



Rys. 3. Zależność pomiędzy pobieraniem tlenu przez skórę a ciśnieniem cząstkowym tlenu w wodzie. Oś odciętych — ciśnienie cząstkowe tlenu w mm Hg; oś rzędnych — ilość tlenu pobrana przez skórę zwierzęcia w $\text{cm}^3/15'$. *Rana esculenta* № 1, ♀, ciężar 45.3 g. Prosta I — w temp. 14°C (tab. II), prosta II — w temp. 4°C (tab. III).

Fig. 3. Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut von dem Sauerstoffpartialdruck im Wasser. Abszissen: — Sauerstoffaufnahme durch die Haut in $\text{cm}^3/15'$. Gerade I: — bei 14°C (Tab. II). Gerade II: — 4°C (Tab. III).

wewnętrznych, wykonywałem znaczną liczbę pomiarów na tem samym zwierzęciu, przyczem zwierzę znajdowało się w stanie głodu. Doświadczenia były przeprowadzone w trzech temperaturach: 4° , 14° , 24° .

Tabela II i III oraz rys. 3, przedstawiają doświadczenia, wykonane na żabie № 1 w temperaturze 14° i 4° . Tabele IV i V tudzież rys. 4 ujmują to samo zjawisko na żabie № 2, w temperaturze 14° i 24° . Na rysunkach widzimy, że charakter prostej proporcjonalności pomiędzy ciśnieniem cząstkowym tlenu w środowisku zewnętrznym a natężeniem pobierania tlenu przez skórę rzeczywiście występuje, aczkolwiek dyspersja poszczególnych punktów jest bardzo duża.

Tabela II.

Zależność pobierania tlenu przez skórę od cząstkowego ciśnienia tego gazu w wodzie w temp. 14°. Dośw. 62, żaba № 1, *Rana esculenta* L ♀. Ciężar żaby 45.3 g. Wszystkie pomiary, trwające 2—3 godzin, wykonano od 1/VI do 10/VI. 1928.

Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut vom Sauerstoffpartialdruck im Wasser bei 14° C. Versuch 62, Frosch № 1, Rana esculenta L ♀. Gewicht 45.3 g. Alle, 2—3 Stunden dauernde Messungen, sind vom 1/VI bis zum 10/VI. 1928 ausgeführt worden.

№ kolejny	Średnia zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Was.</i>	Średnie ciśnienie cząstkowe tlenu w komorze oddechowej <i>Durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck in der Respirationkammer</i>	Ilość pobranego przez skórę zwierzęcia tlenu <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
	dopływającej zufließendes W.	wypływającej abfließendes W.			
<i>Laufende № der Messungen</i>	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	mm Hg	cm ³ /15'
7	5.39	3.93	83	102	0.12
14	5.05	4.78	406	107	0.11
5	5.52	4.39	121	108	0.14
11	5.34	5.17	426	115	0.07
2	5.86	5.45	432	123	0.18
3	6.14	5.48	302	127	0.20
6	7.13	6.64	407	150	0.20
8	7.67	7.21	406	162	0.19
10	8.22	7.65	399	172	0.23
13	8.50	7.95	412	179	0.23
4	8.74	8.19	412	185	0.23
9	10.17	9.46	413	214	0.29
1	11.02	10.09	399	220	0.37
12	11.48	10.72	428	242	0.33

Tabela III.

Zależność pobierania tlenu przez skórę od cząstkowego ciśnienia tego gazu w wodzie, w temp. 4°. Dośw. 60, żaba № 1, *Rana esculenta* L ♀, ciężar żaby 45.3 g. Wszystkie pomiary, trwające po 2—3 godzin, wykonano od 31/V do 13/VI. 1928.

Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut vom Sauerstoffpartialdruck im Wasser bei 4° C. Vers. 60. Frosch № 1, Rana esculenta L ♀. Gewicht 45.3 g. Alle, 2—3 Stunden dauernde Messungen, sind vom 31/V bis zum 13/VI. 1928 ausgeführt worden.

№ kolejny pomiaru	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Wassers</i>	Średnie ciśnienie cząstkowe tlenu w komorze oddechowej <i>Durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck in der Respirationkammer</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę zwierzęcia <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
	dopływającej zufließendes W.	wypływającej abfließendes W.			
<i>Laufende № der Messungen</i>	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	mm Hg	cm ³ /15'
2	4.58	4.34	128	77	0.03
5	7.35	6.83	124	122	0.07
3	9.24	8.20	124	151	0.13
1	9.35	8.26	124	152	0.14
4	10.99	9.37	128	177	0.18

Tabela IV.

Zależność pobierania tlenu przez skórę od cząstkowego ciśnienia tego gazu w wodzie w temp. 14°. Dośw. 64. Żaba № 2, *Rana esculenta* L ♀, ciężar 50.1 g. Wszystkie pomiary, trwające po 2—3 godzin, wykonano od 14/VI do 25/VI. 1928.

Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut vom Sauerstoffpartialdruck im Wasser bei 14°. Vers. № 64. Frosch № 2, Rana esculenta L ♀, Gewicht 50.1 g. Alle, 2—3 Stunden dauernde Messungen, sind vom 14/VI bis 25/VI. 1928 ausgeführt worden.

№ kolejny pomiaru	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Wassers</i>	Średnie ciśnienie cząstkowe tlenu w komorze oddechowej <i>Durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck in der Respirationskammer</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę zwierzęcia <i>Menge der durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
	dopływającej zufließendes W.	wypływającej abfließendes W.			
<i>Laufende № der Messungen</i>	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	mm Hg	cm ³ /15'
1	4.76	4.49	444	101	0.12
2	4.82	4.55	452	102	0.13
4	6.10	5.50	431	127	0.26
7	6.55	6.00	408	137	0.22
6	7.02	6.26	387	145	0.29
5	8.24	7.36	433	170	0.38
3	8.77	7.81	408	181	0.39
9*	8.60	7.71	369	178	0.33
8*	9.39	8.46	417	195	0.39

* Pomiary 8 i 9 wykonano po uprzednim zastrzyknięciu 0.25 cm³ pituitryny.

* Messungen 8 und 9 sind nach Injection von 0.25 cm³ Pituitrin ausgeführt worden.

Tabela V.

Zależność pobierania tlenu przez skórę od ciśnienia cząstkowego tego gazu w wodzie w temp. 24°. Dośw. № 65. Żaba № 2, *Rana esculenta* L ♀, ciężar zwierzęcia 50.1 g. Wszystkie pomiary, trwające po 2—3 godzin, wykonano od 16/VI do 22/VI. 28.

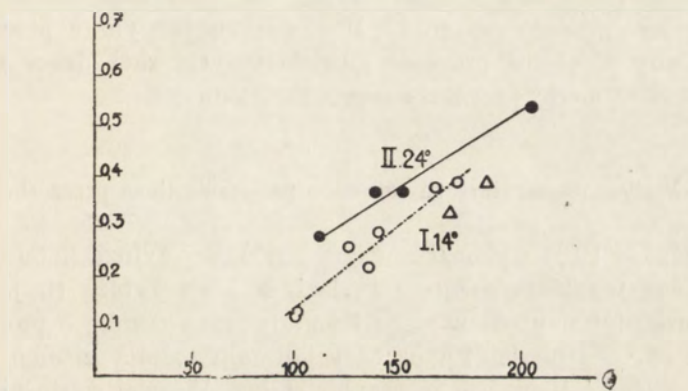
Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut vom Sauerstoffpartialdruck im Wasser bei 24°. Vers. № 65. Frosch № 2, Rana esculenta L ♀, Gewicht 50.1 g. Alle, 2—3 Stunden dauernde Messungen, sind vom 16/VI bis 22/VI. 28 ausgeführt worden.

№ kolejny pomiaru	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Wassers</i>	Średnie ciśnienie cząstkowe tlenu w komorze oddechowej <i>Durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck in der Respirationskammer</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę zwierzęcia <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
	dopływającej zufließendes W.	wypływającej abfließendes W.			
<i>Laufende № der Messungen</i>	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	mm Hg	cm ³ /15'
1	4.57	4.00	484	113	0.28
2	5.69	4.89	463	140	0.37
3	6.23	5.42	450	154	0.37
4	8.82	7.66	464	218	0.54

Na przytoczonych rysunkach widzimy również, że charakter zależności pomiędzy ciśnieniem tlenu a pobieraniem tego gazu

przez skórę nie ulega zmianie pod wpływem temperatury. Natomiast natężenie pobierania jest zawsze większe w temperaturze wyższej. Wpływ temperatury na pobieranie omówiony jest w rozdziale następnym.

Doświadczenia podobne zostały wykonane przez PÜTTERA ('14, '17), który stwierdził, że w temp. 0° przy ciśnieniu tlenu, wynoszącym 90 mm Hg, w temp. zaś 10° przy ciśnieniu = 130 mm Hg zostaje osiągnięta wartość graniczna zużycia tlenu, innymi słowy: przy dalszym zwiększaniu ciśnienia poza wyżej podane wartości pobieranie tlenu nie zwiększa się. W moich natomiast doświadczeniach powyższa wartość graniczna nie została osiągnięta w temp. 4° nawet przy ciśnieniu 160 mm Hg.



Rys. 4. Zależność pomiędzy pobieraniem tlenu przez skórę a ciśnieniem cząstkowym tlenu w wodzie. Oś odciętych — ciśnienie cząstkowe tlenu w mm Hg; oś rzędnych — ilość tlenu pobrana przez skórę zwierzęcia w $\text{cm}^3/15'$ *Rana esculenta* ♀, № 2, ciężar 50.1 g. Prosta I — w temp. 14° C (tab. IV), prosta II — w temp. 24° C (tab. V). Punkty, zaznaczone trójkątami, odpowiadają pobieraniu tlenu w temp. 14° po zastrzyku pituitryny.

Fig. 4. Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme durch die Haut von dem Sauerstoffpartialdruck im Wasser. Abszissen: — Sauerstoffpartialdruck in mm Hg. Ordinaten: — Sauerstoffaufnahme durch die Haut in $\text{ccm}^3/15'$. Mit Δ bezeichnete Punkte bedeuten Sauerstoffaufnahme bei 14° nach Pituitrininjektion.

Pragnąc wyjaśnić dyspersję punktów, oznaczających natężenie pobierania tlenu (rys. 3 i 4), powziąłem przypuszczenie, że powodem jej może być zmiana powierzchni wymiany gazów, wywołana zwięźaniem się lub rozszerzaniem naczyń krwionośnych skóry. Przypuszczenie to oparłem na twierdzeniu KROGHA ('04), z którego wynika, że oddychanie skórne może być regulowane w wąskich granicach na drodze naczynioruchowej. W celu

sprawdzenia swego przypuszczenia wykonałem dwa doświadczenia, w których żabie № 2, uprzednio kilkakrotnie badanej, zastrzykiwałem przed każdym doświadczeniem po 0.25 cm³ pituitryny (preparat Parke & Davis) dla wywołania skurczu naczyń włoskowatych skóry. Wyniki doświadczeń są oznaczone na rys. 4 trójkątami. Stwierdzamy, że w obu przypadkach punkty, odpowiadające pobieraniu tlenu przez skórę po zastrzyku pituitryny, leżą poniżej interpolowanej przez nas prostej, aczkolwiek odchylenia nie przekraczają wahań, występujących w doświadczeniach nad zwierzętami normalnymi (rys. 3). Na podstawie więc tych doświadczeń możemy twierdzić tylko, że skurcz naczyń krwionośnych może powodować zmiany w natężeniu pobierania tlenu przez skórę, musimy jednak przyjąć, że prócz tego wchodzi tu w grę inne jeszcze czynniki. Możliwe, że jednym z powodów są zmiany natężenia procesów oksydacyjnych, zachodzące w organizmie w miarę przedłużającego się głodu.

III. Wpływ temperatury na natężenie pobierania tlenu przez skórę.

KROGH ('19) wykonał pomiary szybkości dyfuzji tlenu przez izolowane tkanki zwierzęce i znalazł, że stała dyfuzji (t. j. ilość cm³ gazu, dyfundująca w ciągu 1 minuty przez tkankę o powierzchni 1 cm² i grubości 1 μ przy zachowaniu różnicy ciśnień gazu 760 mm Hg) zmienia się w przybliżeniu o 1% swej wartości podczas zmian temperatury o 1°. Innymi słowy — przybliżona wartość współczynnika Q_{10} dla zmian szybkości dyfuzji tlenu przez tkankę wynosi 1.1.

Z drugiej strony, na podstawie szeregu prac, dotyczących wpływu temperatury na oddychanie całego zwierzęcia¹⁾, wiemy, że wartość współczynnika Q_{10} w tym ostatnim przypadku jest znacznie wyższa, najczęściej waha się w granicach od 2 do 3, dochodząc w niskich temperaturach do 5.

Powstało więc pytanie, jak zmienia się pod wpływem temperatury szybkość pobierania tlenu przez skórę u żaby, pozbawionej oddychania płucnego.

¹⁾ Literatura, dotycząca tego zagadnienia, jest zebrana w książce KANITZA ('15).

Doświadczenia, które miały dostarczyć odpowiedzi na to pytanie, wykonywałem w obu środowiskach: wodnem (tabela VI) i powietrznem (tabela VII) w temperaturach 4°, 14° i 24°.

Tabela VI.

Wpływ temperatury na natężenie pobierania tlenu przez skórę w wodzie. *Rana esculenta* L.
Einfluss der Temperatur auf die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut, im Wasser.
Rana esculenta L.

№ doświadczenia № des Versuches	№ zwierzęcia № des Tieres	Płeć Geschlecht des Tieres	Ciężar zwierzęcia Gewicht des Tieres g	Temperatura basenu Temperatur im Bassin °C	Ilość tlenu pobrana przez skórę żaby Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes cm ³ /15'	Q ₁₀
63	1	♂	45.3	24	0.35	} 1.6
62	1	♂	45.3	14	0.22	
60	1	♂	45.3	4	0.15	} 1.5
64	2	♂	50.1	24	0.40	
65	2	♂	50.1	14	0.32	} 1.3

Tabela VII.

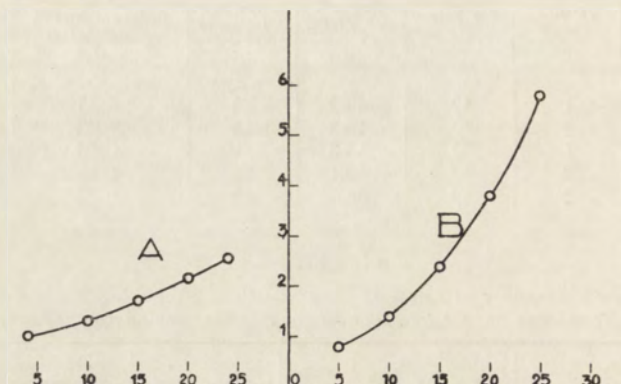
Wpływ temperatury na natężenie pobierania tlenu przez skórę w powietrzu.
Einfluss der Temperatur auf die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut in der Luft.

№ doświadczenia № des Versuches	Gatunek zwierzęcia Tierspezies	Płeć Geschlecht des Tieres	Ciężar zwierzęcia Gewicht des Tieres g	Data Datum	Czas trwania doświadczenia Dauer des Versuches h	Temperatura basenu Temperatur im Bassin °C	Ilość tlenu pobrana przez skórę żaby Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes cm ³ /15'	Q ₁₀
73	<i>R. esculenta</i>	♂	52.2	1.XI.28	2	24	0.38	} 1.4
73	<i>R. esculenta</i>	♂	52.2		2 1/2	14	0.28	
73	<i>R. esculenta</i>	♂	52.2	2.XI.	2 1/2	4	0.16	
73	<i>R. esculenta</i>	♂	52.2		1 1/2	14	0.26	
73	<i>R. esculenta</i>	♂	52.2		1 1/2	24	0.37	} 1.4
74	<i>R. temporaria</i>	♂	57.3	3.XI.	2	4	0.19	
74	<i>R. temporaria</i>	♂	57.3		2	14	0.30	} 1.6
74	<i>R. temporaria</i>	♂	57.3		2	24	0.53	
75	<i>R. esculenta</i>	♂	57.1	4.XI.	2	14	0.23	} 1.8
75	<i>R. esculenta</i>	♂	57.1		2	24	0.41	

Zwierzętom badanym w środowisku powietrznem uniemożliwiałem oddychanie płucne przy pomocy pałeczki szklanej, wprowadzanej do krtani. Doświadczenia w środowisku powietrznem zostały wykonane pod ciśnieniem cząstkowym tlenu = 160 mm Hg. Liczby, oznaczające natężenie pobierania tlenu w wodzie, zostały otrzymane drogą interpolacji pomiarów, omówionych w roz-

dziale poprzednim, i odpowiadają pobieraniu pod ciśnieniem również 160 mm Hg. Porównywałem pobieranie tlenu w różnych temperaturach zawsze na tej samej żabie.

Jak widzimy z tabel VI i VII, wartość współczynnika Q_{10} obliczona dla odstępów temperatur $4^{\circ} - 14^{\circ}$, oraz $14^{\circ} - 24^{\circ}$ jest zawsze niższa od 2, przyczem powyższe wartości, znalezione zarówno dla środowiska wodnego, jak i powietrznego, wahają się w jednakowych granicach. Średnia wartość obliczona z obu tabel wynosi $Q_{10} = 1.6^1$.



Rys. 5. Zależność pobierania tlenu od temperatury. Oś odciętych — temperatura w stopniach Celsjusza; oś rzędnych — ilość pobranego tlenu w jednostkach dowolnych. Krzywa A, przedstawiająca zmiany natężenia pobierania tlenu przez skórę przy uniemożliwionem oddychaniu płucnem, została wykreślona na podstawie znalezionej przez nas wartości Q_{10} . Krzywa B, wzięta z pracy Krogh'a ('14), przedstawia wpływ temperatury na natężenie pobierania tlenu przy równoczesnem oddychaniu płucami i skórą.

Rys. 5. Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der Temperatur. Abszissen:— Temperatur in °C. Ordinate:— Menge des aufgenommenen Sauerstoffes in relativen Einheiten. Kurve A stellt die Veränderungen der Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut bei ausgeschalteter Lungenatmung dar. Gezeichnet auf Grund des vom Verfasser gefundenen Wertes Q_{10} . Die Kurve B — aus Krogh's Arbeit: — sie stellt die Änderungen der Sauerstoffaufnahme durch die beiden Atmungsflächen (Haut und Lungen) dar.

Korzystając ze znalezionej przez nas wartości Q_{10} , wykreśliamy krzywą pobierania tlenu przez skórę w jednostkach względnych, przyjmując natężenie pobierania tlenu w temperaturze 4° za jedność. Porównyując otrzymaną przez nas krzywą (rys. 5A),

¹⁾ Wartość znalezionej przez nas nie jest porównywalna z wartością znalezionej przez PÜTTERA ('14) $Q_{10} = 2.5$, albowiem ta ostatnia jest obliczona na podstawie oznaczeń zużycia tlenu przez zwierzę, znajdujące się pod innym w każdej temperaturze ciśnieniem O_2 w wodzie.

z krzywą otrzymaną przez KROGHA ('14) (rys. 5B), ilustrującą pobieranie tlenu u żaby przez obie powierzchnie wymiany, t. j. przez płuca i skórę, widzimy, że krzywa KROGHA wznosi się bardziej stromo, niż krzywa, przedstawiająca pobieranie tlenu przez skórę. Stąd wnioskujemy, że stosunek pobierania tlenu przez skórę do pobierania tego gazu przez obie powierzchnie zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury.

Druga konsekwencja, wynikająca z powyższych faktów, jest następująca. Gdyby w naszych doświadczeniach pod wpływem temperatury zmieniała się tylko stała dyfuzji, jak to miało miejsce w badaniach nad szybkością dyfuzji tlenu przez tkankę izolowaną, umieszczoną w środowisku zastępczym, gdzie można utrzymywać stałe ciśnienie cząstkowe gazu po obu stronach błony (KROGH) — należałoby oczekiwać wartości współczynnika Q_{10} bliskiej 1.1. Tymczasem tak nie jest. Znaleziona przez nas wartość jest wyższa. Wnioskujemy stąd, że pod wpływem zmian temperatury występują w organizmie swoiste zmiany, które wpływają na szybkość pobierania tlenu przez skórę w ten sposób, że pobieranie tego gazu wzrasta wraz z temperaturą szybciej, niż stała dyfuzji. Wydaje się prawdopodobne, że powodem stosunkowo wysokiej wartości Q_{10} są zmiany zawartości tlenu we krwi, uzależnione od dysocjacji hemoglobiny.

IV. Zmiany natężenia pobierania tlenu w zależności od czasu.

Poprzednio wykazaliśmy, że natężenie pobierania tlenu przez skórę żaby, pozbawionej możliwości oddychania płucnego, nie zależy od środowiska. W doświadczeniach tych badałem jednak zwierzęta przeważnie po upływie doby od chwili wyłączenia oddychania płucnego. Nasunęło się więc pytanie, jak wpływa na natężenie pobierania tlenu przejście zwierzęcia normalnego z jednego środowiska do drugiego. W celu wyjaśnienia tego zagadnienia wykonałem dwa rodzaje doświadczeń, przenosząc zwierzę z powietrza do wody i przeciwnie — z wody do powietrza.

W pierwszym przypadku zależało mi na wyjaśnieniu kwestji, czy po przejściu do środowiska wodnego natężenie pobierania tlenu przez skórę zmienia się w zależności od czasu przebywania zwierzęcia w tem nowem środowisku. Można było bowiem przypuszczać, że po wyłączeniu oddychania płucnego skóra będzie choć

w części pełniła funkcję zastępczą płuc. Gdyby tak było istotnie, natężenie pobierania tlenu przez skórę wzrastałoby z biegiem czasu w miarę wzrastającego zapotrzebowania tlenu.

Doświadczenia przeprowadziłem w następujący sposób. Umieściłem zwierzę na kilkanaście godzin w komorze oddechowej aparatu wodnego, przepuszczając stały prąd wody wodociągowej, i mierzyłem w pewnych odstępach czasu intensywność pobierania O_2 przez skórę.

Tabele VIII i IX przedstawiają dwa takie doświadczenia długotrwałe. Stwierdzamy, że natężenie pobierania waha się w pewnych granicach, ale nie wykazuje żadnych kierunkowych zmian w zależności od czasu trwania doświadczenia. Niestety, ani temperatura, ani ciśnienie cząstkowe tlenu nie były stałe. Jak widać z tabel, oba te czynniki wahały się jednak w granicach niezbyt szerokich. Dla porównania, jakie wahania występują w natężeniu pobierania tlenu przez skórę, przy możliwie ścisłym ustaleniu wszystkich warunków zewnętrznych w doświadczeniach krótkotrwałych, przytaczam tabelę X. Jak widzimy, wahania w natężeniu pobierania tlenu w doświadczeniach długotrwałych (tabele VIII i IX) niewiele przekraczają wahania, które stwierdzamy w doświadczeniu przedstawionem w tabeli X.

Wnioskujemy więc, że u żaby, której wyłączono oddychanie płucne, natężenie pobierania tlenu przez skórę nie zależy od czasu, w ciągu którego żaba oddycha tylko skórą.

Należy zaznaczyć, że doświadczenia długotrwałe w środowisku wodnym wykonywał pierwszy PÜTTER ('14) i przyszedł do podobnego wniosku — oddychanie skórne nie zmienia się z biegiem czasu. Jednak liczby PÜTTERA oznaczają tylko średnie wartości zużycia tlenu na godzinę i są obliczone z różnych doświadczeń, trwających różne okresy czasu.

Drugi rodzaj doświadczeń był wykonany w sposób następujący. Zwierzę normalne, które przez pewien czas przebywało pod wodą, przenosiliśmy do aparatu powietrznego, dając możliwość oddychania także i płucami. Rysunek 6 przedstawia wyniki trzech takich doświadczeń¹⁾. Czas był mierzony od momentu wyjęcia zwierzęcia z wody. Jak widzimy, po upływie 45 — 90 minut od

¹⁾ Liczby, które posłużyły dla wykreślenia krzywej II, przytaczam w tabeli XI.

Tabela VIII.

Badanie wpływu czasu przebywania żaby w wodzie na natężenie pobierania tlenu przez skórę. Dośw. № 18, 12/XII.27. *Rana temporaria* ♂.

Untersuchung des Einflusses der Dauer des Aufenthaltes des Frosches im Wasser auf die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut. Vers. № 18, 12/XII 27. Rana temporaria ♂.

Moment wzięcia próbki wody do analizy <i>Moment des Entnehmens der Wasserprobe zur Analyse</i>	Temperatura basenu <i>Temperatur im Bassin</i>	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Wassers</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę żaby <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
		dopływającej <i>zufließendes W.</i>	wypływającej <i>abfließendes W.</i>		
h	°C	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	cm ³ /15'
10 ⁴⁰	14.2	6.65	6.04	316	0.19
11 ¹⁷					
11 ⁴⁷					
13 ¹⁷					
13 ⁴⁷					
14 ¹⁷					
14 ⁴⁷					
15 ¹⁷					
15 ⁴⁷					
16 ¹⁷					
17 ¹⁷					
17 ⁴⁷					
18 ¹⁷					

Tabela IX.

Badanie wpływu czasu przebywania żaby w wodzie na natężenie pobierania tlenu przez skórę. Dośw. № 17, *Rana esculenta* L.

Untersuchung des Einflusses der Dauer des Aufenthaltes des Frosches im Wasser auf die Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut. Vers. Nr. 17. Rana esculenta L.

Data <i>Datum</i>	Moment wzięcia próbki wody do analizy <i>Moment des Entnehmens der Wasserprobe zur Analyse</i>	Temperatura basenu <i>Temperatur im Bassin</i>	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des durch den Apparat durchfließenden Wassers</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę żaby <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
			dopływającej <i>zufließendes W.</i>	wypływającej <i>abfließendes W.</i>		
	h	°C	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	cm ³ /15'
8.XII	10 ⁰⁰	16.2	6.56	6.11	460	0.21
	11 ⁰⁷					
	11 ³⁷					
	14 ⁰⁷					
	14 ³⁷					
	17 ⁰⁷					
	17 ³⁷					
	20 ⁰⁷					
	20 ³⁷					
	20 ⁰⁷					
9.XII	10 ³⁷	15.8	7.79	7.16	420	0.26
	11 ⁰⁷					
	11 ³⁷					
	11 ³⁷					

Tabela X.

Wahania, występujące w natężeniu pobierania tlenu przez skórę, przy możliwie ściślejm zachowaniu wszystkich warunków zewnętrznych. Dośw. № 53, 5/V. 1928. *Rana esculenta*. Schwankungen in der Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die Haut, bei möglichst präziser Berücksichtigung aller äusserer Bedingungen. Vers. Nr. 53. 5/V. 1928. *Rana esculenta*.

Moment wzięcia próbki wody do analizy <i>Moment des Entnehmens der Wasserprobe zur Analyse</i>	Temperatura basenu <i>Temperatur im Bassin</i>	Zawartość tlenu w litrze wody <i>Sauerstoffgehalt in 1 Liter Wasser</i>		Średnia szybkość przepływu wody przez aparat <i>Durchschnittliche Geschwindigkeit des Durchfließens des Wass. durch den Apparat</i>	Ilość tlenu pobrana przez skórę żaby <i>Menge des durch die Haut des Tieres aufgenommenen Sauerstoffes</i>
		dopływającej <i>zufließendes W.</i>	wypływającej <i>abfließendes W.</i>		
h	°C	cm ³	cm ³	cm ³ /15'	cm ³ /15'
16 ⁴⁵	14 + 0.3				
17 ⁴⁵		7.10	6.61	414	0.20
18 ⁰⁰		7.17	6.62	410	0.21
18 ¹⁵		7.16	6.60	402	0.20
18 ³⁰		7.06	6.70	402	0.14
18 ⁴⁵		7.18	6.69	388	0.19

Tabela XI.

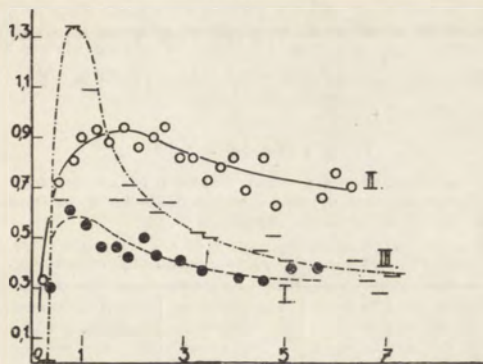
Zmiany, występujące w natężeniu pobierania tlenu przez obie powierzchnie oddechowe (skórę i płuca) po przeniesieniu zwierzęcia z wody do powietrza. Dośw. 59. *Rana esculenta* ♂. Żaba była w wodzie od 20⁰⁰ 24/V do 9⁰⁰ 25/V. 28. Temp. basenu 17.5°.

Die Änderungen der Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die beiden Atmungsoberflächen (Haut und Lungen) nachdem das Tier aus dem Wasser in die Luft übertragen worden war. Der Frosch beand sich im Wasser von 20⁰⁰ 24/V bis 9⁰⁰ 25/V. 28. Temperatur im Bassin 17.5°. Vers. 59. *Rana esculenta* ♂.

№ kolejny pomiaru <i>Laufende Nr. der Messungen</i>	Pomiar trwał: <i>Eine Messung dauerte</i>		Ilość tlenu pobrana przez żabę <i>Menge des vom Tier aufgenommenen Sauerstoffes</i>	№ kolejny pomiaru <i>Laufende Nr. der Messungen</i>	Pomiar trwał: <i>Eine Messung dauerte</i>		Ilość tlenu pobrana przez żabę <i>Menge des vom Tier aufgenommenen Sauerstoffes</i>
	od <i>von</i>	do <i>bis</i>			od <i>von</i>	do <i>bis</i>	
	h	h	cm ³ /15'		h	h	cm ³ /15'
1	10 ⁰³	10 ¹⁸	0.34	12	13 ⁰⁵	13 ²⁰	0.82
2	10 ²¹	10 ³⁶	0.72	13	13 ²³	13 ³⁸	0.73
3	10 ³⁹	10 ⁵⁴	0.81	14	13 ³⁸	13 ⁵²	0.78
4	10 ⁵⁴	11 ⁰⁹	0.90	15	13 ⁵⁵	14 ¹⁰	0.82
5	11 ¹²	11 ²⁷	0.93	16	14 ¹⁰	14 ²⁵	0.69
6	11 ²⁷	11 ⁴²	0.83	17	14 ²⁹	14 ⁴⁴	0.82
7	11 ⁴⁵	12 ⁰⁰	0.94	18	14 ⁴⁴	14 ⁵⁹	0.63
8	12 ⁰⁰	12 ¹⁵	0.86	19	15 ⁴⁰	15 ⁵⁵	0.66
9	12 ¹⁷	12 ³²	0.90	20	15 ⁵⁵	16 ¹⁰	0.76
10	12 ³²	12 ⁴⁷	0.95	21	16 ¹⁴	16 ²⁹	0.73
11	12 ⁵⁰	13 ⁰⁵	0.82				

chwili wyjęcia z wody występuje wyraźne maksimum pobierania tlenu. Po tym okresie pobieranie spada mniej lub więcej łagodnie, zbliżając się do pewnej granicy.

Wzrost natężenia pobierania tlenu w pierwszym okresie po przeniesieniu zwierzęcia do powietrza wskazuje, że w warunkach naszych doświadczeń podczas pobytu w wodzie zwierzę było niedostatecznie zaopatrzone w tlen.



Rys. 6. Zmiany, występujące w natężeniu pobierania tlenu przez obie powierzchnie oddechowe (skórę i płuca) po przeniesieniu zwierzęcia z wody do powietrza. Oś odciętych — czas w godzinach, mierzony od chwili wyjęcia żaby z wody, oś rzędnych — ilość pobranego tlenu w $\text{cm}^3/15'$.

Fig. 6. Die Änderungen der Intensität der Sauerstoffaufnahme durch die beiden Atmungsflächen (Haut und Lungen), nachdem das Tier aus dem Wasser in die Luft übertragen worden war. Abszissen: — Zeit in Stunden, gemessen von dem Momente an, als das Tier das Wasser verlassen hat. Ordina-ten: — Menge des aufgenommenen Sauerstoffes in $\text{ccm}/15'$.

Z opisanych doświadczeń wynika również, że po przeniesieniu zwierzęcia do powietrza zwiększa ono natężenie pobierania tlenu kosztem oddychania płucnego: wykazaliśmy bowiem, że u zwierząt, pozbawionych możliwości oddychania płucnego, przejście z jednego środowiska do drugiego nie powoduje zmian natężenia pobierania tlenu przez skórę.

V. Badanie gazów płuc.

W doświadczeniach poprzednich wykazaliśmy, że po przeniesieniu zwierzęcia normalnego z wody do powietrza natężenie pobierania tlenu wykazuje wzrost, spowodowany niedostatecznym dopływem tlenu do organizmu podczas przebywania zwierzęcia w środowisku wodnym. W celu zbadania, jak daleko jest posunięty stan niedotleniania zwierzęcia, przebywającego w wodzie, oraz jaki wpływ na to zjawisko wywiera temperatura, wykonałem doświadczenia, w których badałem powietrze płucne żaby, prze-

bywającej w wodzie. Drugą ciekawą kwestją było sprawdzenie, czy oprócz niedotleniania występuje gromadzenie się CO₂ w organizmie ¹⁾.

Wykonałem dwa rodzaje doświadczeń: w jednych badałem wpływ temperatury na szybkość znikania tlenu z zamkniętego w płucach powietrza (tabela XII), w drugich — stan końcowy zawartości tlenu w powietrzu płucnym (tabela XIII).

Tabela XII.

Zmiany procentowej zawartości tlenu w płucach żaby w czasie przebywania zwierzęcia pod wodą w dwu różnych temperaturach. Oba doświadczenia na *Rana esculenta* ♀ ♀ (różne osobniki).

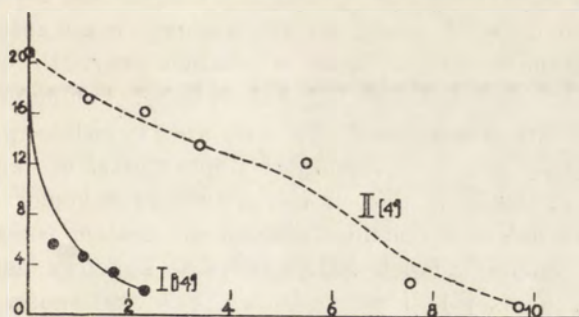
Änderungen des perzentuellen Sauerstoffgehaltes in der Lungenluft des im Wasser befindlichen Tieres bei zwei verschiedenen Temperaturhöhen.

№ doświadczenia Nr. des Versuches	Moment wzięcia próbki gazu do analizy Moment des Entnehmens der Gasprobe zur Analyse h	Temperatura basenu Temperatur im Bassin °C	Zawartość gazów w powietrzu płucnym Gehalt an Gasen in der Lungenluft	
			CO ₂ %	O ₂ %
68	11 ¹⁰	14 ⁰		20.9
	11 ⁴⁰	14	1.7	5.65
	12 ¹⁵	14	1.5	4.7
	12 ⁵¹	14	1.4	3.5
	13 ²⁷	14	1.5	2.2
69	10 ³⁰	4 ⁰	—	20.9
	11 ⁴²	4	1.3	17.2
	12 ⁴⁷	4	1.2	16.2
	13 ⁵²	4	0.8	13.5
	15 ⁵⁷	4	0.9	12.25
	18 ⁰³	4	0.8	2.8
	20 ⁰⁵	4	1.0	1.0

Tabela XII przedstawia dwa doświadczenia pierwszego typu. Oba doświadczenia zostały wykonane na *Rana esculenta* ♀ zbliżonej wagi, jedno w temperaturze 4⁰, drugie w temperaturze 14⁰. Oba żabom zamknąłem w płucach po 8 cm³ powietrza, uprzednio tam wprowadzonego. Po dokonanych zabiegu umieściłem zwierzę w komorze wodnego aparatu oddechowego, przez który przepływał stały prąd wody wodociągowej. Co pewien czas żabę wyjmowałem i pobierałem zapomocą strzykawki próbki gazu z płuc do analizy. Jak widzimy z tabeli XII i rys. 7 —

¹⁾ DOLK i POSTMA ('27) wzmiankują (str. 422), że w powietrzu płucnym żaby, znajdującej się pod wodą, zawartość CO₂ = 1.75%, O₂ = 5%. Żadnych szczegółów doświadczenia autorowie nie podają.

czas, w którym zawartość tlenu w płucach dochodzi do 2%, jest w temperaturze 4° 3½ razy większy, niż w temp. 14°.



Rys. 7. Zmiany procentowej zawartości tlenu w płucach żaby w czasie przebywania zwierzęcia pod wodą w dwu różnych temperaturach. Odcięte — czas w godzinach, mierzony od chwili ukończenia operacji; rzędne — procentowa zawartość tlenu w płucach. Krzywa I w temp. 14°, krzywa II w temp. 4°.

Fig. 7. Änderungen des perzentuellen Sauerstoffgehaltes in der Lungenluft des im Wasser befindlichen Tieres bei zwei verschiedenen Temperaturhöhen. Abszissen: — Zeit in Stunden, gemessen nach Beendigung der Operation. Ordinalen: — perzentueller Sauerstoffgehalt der Lungenluft. Kurve I — bei 14°, Kurve II — 4°.

W tabeli XIII są zestawione wyniki doświadczeń, w których chodziło mi o stwierdzenie, czy końcowa (minimalna) za-

Tabela XIII.

Badanie wpływu temperatury na końcową (minimalną) zawartość procentową tlenu w powietrzu płucnym żaby, przebywającej w wodzie. Oba doświadczenia na *Rana esculenta* ♂♂ (osobniki różne).

Untersuchung des Temperatur-Einflusses auf den am Ende des Versuches festgestellten (Minimum) perzentuellen Sauerstoffgehalt in der Lungenluft bei einem im Wasser befindlichen Frosche, bei zwei verschiedenen Temperaturhöhen. Untersuchungsobjekt in den zwei Versuchen: *Rana esculenta* ♂♂ (verschiedene Individuen).

№ doświadczenia Nr. des Versuches	Moment wzięcia próbki gazu do analizy Moment des Entnehmens der Gasprobe zur Analyse h	Temperatura basenu Temperatur im Bassin °C	Zawartość gazu w powietrzu płucnym Gehalt an Gasen in der Lungenluft	
			CO ₂ %	O ₂ %
70	10 ²⁵	14		
	14 ⁵	14	1.6	0.5
	15 ⁰⁰	4		
	16 ⁰⁰	4	1.3	0.7
	19 ⁰⁰	4	1.1	0.6
71	9 ⁵⁰	14		
	14 ⁰⁰	14	1.6	0.8
	14 ³⁰	4		
	18 ⁰⁵	4	0.9	0.6
	26.X 9 ²⁰	14.9	1.4	0.1

wartość tlenu w płucach żaby zależy od temperatury. Po wprowadzeniu pewnej ilości powietrza do płuc trzymałem żabę w aparacie wodnym w temp. 14° w ciągu 4 godzin. Jak się uprzednio przekonałem doświadczalnie, po upływie tego czasu zostaje osiągnięte minimum zawartości tlenu w płucach żaby. Przy dalszym pozostawieniu zwierzęcia w tej temperaturze, minimum to waha się tylko w granicach błędu. Po upływie 4 godzin pobierałem z płuc próbkę gazu do analizy i doprowadzałem temperaturę w otoczeniu żaby do 4° , pozostawiając zwierzę w komorze aparatu wodnego na dalsze 4 godziny, poczem pobierałem znowu próbkę gazu. Jak widzimy z tabeli XIII, zawartość końcowa tlenu w płucach spada poniżej 1% i nie zmienia się w zależności od temperatury.

Z podanych wyżej doświadczeń widzimy, że temperatura wpływa wyraźnie ($Q_{10} = 3.5$) na szybkość znikania tlenu z płuc. Stąd wnioskujemy, że rola płuc maleje wraz z obniżeniem się temperatury. Natomiast minimalna zawartość tlenu w płucach jest stała i nie zależy od temperatury. Wydaje się prawdopodobne, że ta minimalna zawartość odpowiada ciśnieniu tlenu w środowisku wewnętrznym zwierzęcia.

Zawartość CO_2 w powietrzu płucnym nie ulega wyraźnym zmianom ani w zależności od temperatury, ani od czasu przebywania zwierzęcia w wodzie i waha się w granicach od 0.8% do 1.7%. Stwierdzamy więc, że w czasie przebywania w wodzie nie występuje gromadzenie się CO_2 w organizmie.

Omówienie wyników.

DOLK i POSTMA ('27) wyrazili pogląd, że szybkość dyfuzji tlenu przez skórę jest (według definicji BLACKMANA) czynnikiem ograniczającym pobieranie (limiting factor). W rozważaniach tych autorowie nie brali pod uwagę wpływu temperatury. Wszystkie doświadczenia DOLK i POSTMY były wykonane w temperaturze stałej około 25° .

Z doświadczeń zaś, przedstawionych w części faktycznej pracy niniejszej, wynika, że temperatura wywiera swoisty wpływ na układ warunków decydujących o pobieraniu tlenu.

W naszych doświadczeniach maksymalna szybkość pobierania tlenu przez skórę u żaby, pozbawionej oddychania płucnego,

występowała przy najwyższym ze stosowanych przeze mnie ciśnieniu cząstkowym tlenu oraz — najwyższej temperaturze w środowisku zewnętrznym. Warunki jednakże, w których było osiągnięte maksymalne pobieranie tlenu, nie były optymalnymi dla zwierzęcia, pozbawionego możliwości oddychania płucnego. W wyżej podanych warunkach zwierzę zanurzone w wodzie ginie już po kilku godzinach, podczas gdy w temperaturze niskiej W. EDWARDSOWI ('824) udało się zachować żabę przy życiu przez 2½ miesiąca. Niska więc temperatura stwarza optymalne warunki dla życia żaby, oddychającej tylko skórą.

Już z powyższych faktów wynika, że wzrost pobierania tlenu przez skórę podczas wznoszenia się temperatury otoczenia nie może dorównać wzrostowi metabolizmu. Jeszcze wyraźniej uwidocznione jest to zjawisko na rysunku 5. Krzywa *B*, znaleziona przez KROGHA na zwierzętach, oddychających jednocześnie płucami i skórą, przedstawia wzrost metabolizmu, zaś krzywa *A* pobieranie tlenu przez skórę. Jak widzimy, krzywa *A* wznosi się mniej stromo.

Z drugiej strony wykazaliśmy, że szybkość pobierania tlenu przez skórę żywej żaby wzrasta pod wpływem temperatury bardziej, niż szybkość dyfuzji tlenu przez tkankę izolowaną. Gdyby wartość współczynnika Q_{10} dla pobierania tlenu przez skórę wynosiła tylko 1.1, jak wynosi dla tkanek, podniesienie temperatury środowiska, w którym znajduje się zwierzę pozbawione możliwości oddychania płucnego, wywoływałoby jeszcze prędszą asfiksję. Moglibyśmy to zjawisko uważać za pewnego rodzaju „regulację“ pobierania tlenu przez skórę na drodze zmian fizykochemicznych własności krwi. Zakres tej regulacji jest jednak wąski, gdyż w temperaturze powyżej 20° zwierzę, pozbawione oddychania płucnego, prędko ginie.

Z rysunku 5 wywnioskowaliśmy także, że pod wpływem temperatury zmienia się stosunek pobierania tlenu przez płuca do pobierania tlenu przez skórę. Przyszliśmy do przekonania, że jednym z powodów zmian tego stosunku jest zbyt wolny przyrost szybkości pobierania tlenu przez skórę, dzięki czemu udział oddychania skórniego w całkowitej wymianie gazowej zwierzęcia zmniejsza się w wyższych temperaturach. Istnieje także i druga przyczyna zmiany tego stosunku: mianowicie — bardzo silne zmniejszenie się udziału oddychania płucnego w temperaturach

niskich. Wykazaliśmy, że w temperaturze 4° ta sama ilość tlenu zostaje pobrana przez płuca 3½ razy wolniej, niż w temp. 14°. Oddychanie płucne znajduje więc niekorzystne warunki w temperaturach niskich, rola jego staje się nikła. Dyfuzja tlenu przez skórę, będąca w wysokich temperaturach wyraźnie czynnikiem ograniczającym pobieranie, w niskich temperaturach staje się wielkością tego samego rzędu, co szybkość zachodzących w organizmie procesów oksydacyjnych.

Wnioski.

1°. Po wyłączeniu oddychania płucnego zwierzę pobiera przez skórę w powietrzu i w wodzie (ciśnienie cząstkowe O₂ około 160 mm Hg) jednakowe ilości tlenu.

2°. Pomiędzy ciśnieniem cząstkowym tlenu w wodzie, wahającym się w granicach od 80 do 250 mm Hg, a pobieraniem tlenu przez skórę istnieje prosta proporcjonalność.

3°. Szybkość pobierania tlenu przez skórę po wyłączeniu oddychania płucnego wzrasta wraz z temperaturą, przyczem $Q_{10} = 1.6$. Wobec tego, że — jak to stwierdził KROGH — pobieranie tlenu przez obie powierzchnie oddechowe wzrasta znacznie szybciej, niż pobieranie tlenu wyłącznie przez skórę, wnioskujemy, że udział skóry w całkowitej wymianie gazowej maleje ze wzrostem temperatury.

4°. Intensywność pobierania tlenu przez skórę żaby, przeniesionej z powietrza do wody, nie zmienia się w zależności od czasu przebywania zwierzęcia w tem nowem środowisku.

5°. U żaby, która przebywała przez dłuższy czas w wodzie i która miała zatem zmniejszony dopływ tlenu, pobieranie tego gazu z powietrza przez obie powierzchnie oddechowe wykazuje wyraźne maksimum po upływie 45 — 90 minut od chwili wyjęcia zwierzęcia z wody. W dalszym przebiegu krzywa pobierania tlenu ustala się na pewnym poziomie.

6°. Zawartość tlenu w powietrzu płucnem żaby zanurzonej w wodzie spada poniżej 1%. Czas, po upływie którego zostaje osiągnięta zawartość końcowa, zależy od temperatury; czas ten jest 3½ razy większy w temperaturze 4°, niż w temperaturze 14°. Natomiast zawartość końcowa tlenu w płucach nie zależy od temperatury.

7°. W tych samych co poprzednio warunkach doświadczenia zawartość procentowa CO₂ w powietrzu płucnym nie ulega wyraźnym zmianom w zależności od czasu przebywania zwierzęcia w wodzie. Zawartość ta waha się w granicach od 0,8% do 1,7% i nie zależy od temperatury.

Już po ukończeniu rękopisu niniejszej pracy ukazała się publikacja CHR. BASTERA ('29) [Über die Regulierung des Sauerstoffverbrauches aus der Lunge der Frösche im Hinblick auf ihr Tauchvermögen. Zeitschr. f. vergleich. Physiol. 9 (212)], w której autor badał szczegółowo pobieranie tlenu z powietrza, zamkniętego w płucach żaby zanurzonej w wodzie i stwierdził, że zwierzę reguluje, prawdopodobnie w sposób odruchowy, ilość pobieranego z płuc tlenu na drodze zmian powierzchni naczyń włoskowatych płucnych. W ten sposób żaba przebywająca pod wodą pobiera z powietrza płucnego stałą, zaspakajającą jej potrzeby, ilość tlenu. Regulacja jednak występuje tylko w granicach zawartości tlenu w powietrzu płucnym od 16% — 8%. Powyżej i poniżej tych granic kapilary są już w stanie maksymalnego zwężenia lub rozszerzenia. Doświadczenia te były wykonane w temperaturze około 15°. Tłumaczą one przebieg otrzymanej przez nas krzywej, przedstawionej na rysunku 7. Na krzywej widzimy, że zawartość tlenu w płucach żaby, przebywającej w wodzie o temperaturze 14°, spada gwałtownie do 5%; poniżej 5% — spadek staje się łagodny, gdyż wobec tak małej zawartości tlenu w powietrzu płucnym zwierzę nie może już normować ilości pobieranego tlenu. To samo zjawisko występuje również w temperaturze 4°, jest jednak mało widoczne na naszym rysunku, gdyż odstępy czasu, w których pobierałem próbki gazu, były zbyt długie.

Prócz tego BASTERT wypowiada zdanie, że przez czas przebywania żaby w wodzie zawartość tlenu we krwi zwierzęcia jest stała.

Piśmiennictwo.

- Berg W. 1868. Untersuchungen über die Hautatmung des Frosches. Inaug. Diss. Dorpat. Cyt. wedł. Wintersteina (21). Bohr Chr. 1900. Über die Haut- und Lungenatmung der Frösche. Skand. Arch. f. Physiol. 10 (74). Dolk H. E. und N. Postma. 1927. Über die Haut- und Lungenatmung von *Rana temporaria*. Zeitschr. f. verg. Physiol. 5 (417). Edwards W. 1824. De l'influence des agents physiques sur la vie. Paris. Cyt. wedł. Edwards M.

1857. Leçons sur la physiologie. Paris. 1 (503). **Ege** and **A. Krogh**. 1914. On the relation between temperature and respiratory exchange in fishes. Internat. Revue f. Hydrobiologie und Hydrographie. 7 (48). **Kanitz A.** 1915. Temperatur und Lebensvorgänge. Berlin. **Klug F.** 1884. Über die Hautatmung des Frosches. Arch. f. Anat. und Physiol. (183). **Krogh A.** 1904. On the cutaneous and pulmonary respiration of the frog. Skand. Arch. f. Physiol. 15 (328). **Krogh A.** 1914. The quantitative relation between temperature and standart metabolism in animals. Internat. Zeitschr. f. phys.-chem. Biologie. 1 (491). **Krogh A.** 1919. The rate of diffusion of gases through the animal tissues, with some remarks on the coefficient of invasion. Journ. of Physiol. 52 (391). **Kubie L.** 1927. The solubility of O₂, CO₂ and N₂ in mineral oil and the transfer of carbon dioxide from oil to air. Journ. of biol. Chem. 72 (545). **Pütter A.** 1914. Temperaturkoeffizienten. Zeitschr. f. allg. Physiol. 16 (574). **Pütter A.** 1917. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffdruck. Arch. f. d. ges. Physiol. 168 (491). **Regnault V. et J. Reiset.** 1849. Recherches chimiques sur la respiration des animaux des diverses classes. Ann. Chim. Phys. 26 (476). **Winterstein H.** 1921. Die physikalisch-chemische Erscheinungen der Atmung. Handb. d. verg. Phys. Band 1. Teil 2 (1).

[Zakład Morfologii Doświadczalnej Instytutu im. Nenckiego].

M. Chejfec.

**Długość życia *Paramecium caudatum* w związku
z odżywianiem.**

*Die Lebensdauer von Paramecium caudatum in Abhängigkeit
von der Nahrungsmenge.*

Rękopis nadesłany w dniu 6.X.1929 r.

Die vorliegende Arbeit bezweckt das Feststellen, ob und wie lange sich das individuelle Leben von *Paramecium caudatum* unter Verabreichung einer genau abgemessenen Nahrungsmenge verlängern lässt. In einer früheren Arbeit (CHEJFEC '28) wurde gezeigt, dass die Teilungsrate der Infusorien von der Bakterienzahl in der Kulturflüssigkeit abhängt (Tabelle I). Tabelle II beweist, dass grosse Bakterienkonzentrationen anfangs hemmend wirken, bis durch den Bakterienverbrauch ein Konzentrationsoptimum erreicht wird, wonach die Teilungsrate erheblich steigt. Die Wirkung geringer Konzentrationen ist gerade entgegengesetzt. Auch in reinen Linien tritt die ausschlaggebende Bedeutung der Nahrungsmenge hervor (Tab. III). Es wurde berechnet, dass die absolute von einem *Paramecium*individuum innerhalb einer Stunde aufgenommene Bakterienzahl 100,000 nicht übersteigt, was auch die Versuche bestätigen (Tab. IV). Für mittlere Konzentrationen, bis 15,000 Bakterien in 1 mm³, wurde tatsächlich 100,000 Bakterien als Verbrauchszahl pro Individuum und Stunde gefunden. Zwecks Bestimmung der minimalen Nahrungsmenge, welche die Teilung des Infusors noch ermöglicht, wurden Einzeltiere auf ausgehöhlten Objektträgern in 100 mm³ Flüssigkeit beobachtet. Die Tiere erhielten immer geringere Bakterienanzahl, von 24,000 in 1 mm³ ab. In Konzentration von 15,000 wird die Teilungsrate unregelmässig aber erst in 1500—2000 wird die Teilung aufgehalten. Tab. V bezieht sich auf Tiere,

welche erst nach 30 Tagen eine übrigens ganz normale Teilung durchgemacht hatten. Todesfälle sind in 90 Proz. durch Manipulationsschwierigkeiten verursacht worden.

In weiteren Versuchen kam die Methode der individuellen Zucht zur Anwendung: nur diejenigen Infusorien erhielten Nahrung, deren Aussehen einen ausgesprochenen Hungerszustand anzeigte. Auf diese Weise gelang es die Tiere über 120 Tage ohne Teilung zu züchten (Tab. VI und VII). Fast in allen Fällen wurde der Versuch nicht durch den Tod, sondern durch die Teilung, welche dank einer ungenügend genauen Berechnung der Nahrungsmenge eingetreten war, unterbrochen. Der durch Perioden einer nicht zu intensiven Nahrungszufuhr unterbrochene Hunger wird zum verjüngenden Faktor, ähnlich wie es die Regeneration in HARTMANN'S Versuchen war. Infusorien, bei denen die Teilung aufgehalten war, zeigen dieselbe Plasma-Kernrelation, wie Hungertiere (Tab. VIII): dieselbe verschiebt sich zugunsten des Kernes. Nach jeder Nahrungszufuhr kehrt sie zur Norm zurück. Sonst bleiben die Versuchstiere vollkommen normal.

In zwei Fällen gelang es Paramaecien, die sich eine längere Zeit nicht geteilt hatten, zu zerschneiden. In beiden Fällen erfolgte eine vollständige Regeneration (Fig. 1) innerhalb 5—7 Tage.

In Massenkulturen gelang es in 1000 ccm Flüssigkeit bei einer Konzentration von 1,500 *Bacterium Coli* in 1 mm³, die weitgehend konstante Paramaecienzahl (durchschnittlich 10 in 1 ccm) im Laufe von 3 Monaten aufrechtzuerhalten (Tab. X). Die Tiere erhielten jeden 4. Tag frische Nahrung, wobei die Kulturflüssigkeit ohne Infusorienverlust teilweise gewechselt wurde. Teilungen der Paramaecien und deren Absterben wurden niemals beobachtet und jedenfalls könnten diese Erscheinungen nur ganz ausnahmsweise vorkommen. Wird jedoch die Bakterienkonzentration der Kulturflüssigkeit erhöht, so steigt sofort die Infusorienanzahl (Tab. XI), wird sie verringert, so folgt auch die Paramaecienzahl nach (Tab. XII). In einer Heuinfusion lässt sich eine Konstanz der Infusorienzahl nicht erhalten, sie schwankt vielmehr der schwankenden Bakterienkonzentration parallel (Tab. XIII).

Die Verjüngung durch Teilung stellt demnach nicht die einzige Möglichkeit des Überlebens der Art dar. Das in der Natur sterbliche Individuum kann vielleicht in einem entsprechend gestellten Experiment unsterblich werden.

Die Teilung von Einzeltieren lässt sich also in einer Bakterienkonzentration von 1000 in 1 mm³ 120 Tage lang und darüber aufheben. Wenn man jedoch zum Versuch 20 — 25 Infusorien verwendet, die in 2 — 2.5 ccm. Flüssigkeit verbleiben und dieselbe Bakterienkonzentration erhalten, so tritt schon nach 72 Stunden die Teilung fast sämtlicher Tiere ein, obwohl die absolute und die relative Nahrungsmenge dieselbe geblieben ist (Tab. IX). Das unerwartete Ergebnis könnte durch den allelokatalytischen Faktor ROBERTSONS erklärt werden. Wenn man aber in je 2 ccm Flüssigkeit von derselben Bakterienkonzentration 1, 2 oder 4 *Paramaecien* setzt und nach 3—4 Tagen die Tiere berechnet, so erweist sich, dass die erhaltene Infusorienzahl stets der Ausgangszahl derselben proportional ist (Tab. XIV). Auch die Beobachtungen von 1 und von 2 *Paramaecium*-individuen sowohl auf ausgehöhlten Objektträgern, wie in kleinen Röhrchen haben keine Bestätigung der Befunde ROBERTSONS gebracht. (Tab. XVI). Dafür gelang es festzustellen, dass in Indigo-Suspensionen von bestimmter Teilchenkonzentration in flachen Tropfen 2 *Paramaecien* mehr Nahrungsvakuolen, als ein *Paramaecium* bilden (Tab. XVII). Werden hingegen die Tiere in engen Röhrchen auf einem Klinostaten langsam rotiert, so ergibt sich jener Unterschied nicht. Die Körnchen der Suspension fallen zu Boden, was deren Aufnahme seitens der Infusorien erschwert. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass im Falle zweier Infusorien die Suspension besser aufgewirbelt wird, was deren Aufnahme erleichtert. Eine grössere Teilungsfähigkeit zweier Infusorien in einem flachen Tropfen, mit derjenigen eines Einzeltieres verglichen, hängt also vielleicht nicht mit dem allelokatalytischen Faktor, sondern einfach mit einer besseren Ausnutzung des Nahrungsmediums zusammen. In keinem Versuch wurde die Anwesenheit des allelokatalytischen Faktors festgestellt worden.

Paramaecien, welche von einer normalen, nicht behandelten Kultur stammen, vermögen sich nach einer Waschung im Leitungswasser selbst in ganz ungenügender Nahrungsmenge zu teilen (Tab. IX). Wenn jedoch die Tiere einer bereits durch geregelte Nahrungszufuhr stabilisierten Kultur angehören und deren Waschung unterlassen wird, so liefert deren Beobachtung unter denselben Bedingungen wie in der Tab. IX, ein anderes

Bild, indem die Teilungen kaum zu verzeichnen sind (Tab. XVIII). Nicht also die Nahrungsmenge allein, sondern auch der vorherige Zustand der Tiere ist für das Ergebniss massgebend. Somit spricht auch die Tab. IX eher gegen das Vorhandensein eines allelokatalytischen Faktors, weil hier die Waschung das Teilungsvermögen vergrössert.

Wiemy z prac WOODRUFFA ('08, '09, '11, '12, '13) i METALNIKOWA ('16, '22), że umieranie kultur pierwotniaczych nie jest objawem nieuniknionych starczych zmian organizmu lecz jest wynikiem oddziaływania czynników zewnętrznych, pozakomórkowych. Wychodząc z założenia, iż stopień podzielności można uważać za miarę żywotności kultury, badał WOODRUFF ('11, '13) zależność pomiędzy liczbą podziałów a ilością pokarmu i objętością środowiska zewnętrznego.

W pierwszej serii doświadczeń badacz ten posługiwał się szkiełkami wydrążonymi rozmaitej pojemności, zawierającymi 2, 5, 20 i 50 kropeł środowiska pokarmowego, do których wpuszczał pierwotniaki. W tych warunkach okazało się, że w większych ilościach pożywki podzielność była szybsza. Tak więc podzielność *Paramaecium caudatum* w 5 kroplach przewyższała o 2.4% podzielność w 2, w 20 kroplach o 6.4%, a w 40 kroplach o 7.4% podzielność w 2 kroplach.

W następnej serii doświadczeń zmieniał czas przebywania pierwotniaków w danym środowisku i wykazał, że szybkość występowania po sobie podziałów jest tem większa, im częstsza zmiana pożywki.

Wreszcie w serii trzeciej, jeden z dwóch siostrzanych osobników był przenoszony do świeżej pożywki, drugi do starej, w której uprzednio znajdowały się *Paramaecia*. Okazało się, że stopień podzielności w świeżej pożywce był znacznie wyższy, niż w pożywce już poprzednio używanej, w której jakiś czas trzymano pierwotniaki. W grupie „A”, obejmującej pierwotniaki, przenoszone do świeżej pożywki, notował WOODRUFF dwa podziały w ciągu doby, w grupie „B”, obejmującej pierwotniaki siostrzane, przenoszone do pożywki, w której poprzednio były już *Paramaecia*, podzielność nie przekroczyła 0.5 podziałów w ciągu doby. Krzyżowe przenoszenie pierwotniaków ze środowiska grupy „A” do środowiska grupy „B”, i odwrotnie, podnosiło podzielność z 0.5 do 1.7 lub obniżało ją z 2 do 1 w ciągu doby. Przenoszenie *Paramaecium caudatum* do środowiska, w którym uprzednio były *P. aurelia*, odpowiednio obniża podzielność, natomiast prze-

noszenie wymoczków do środowiska, w którym uprzednio trzymano *Pleurotricha*, nie wpływa na podzielność *Paramaecium*. Naogół mógł WOODRUFF wnioskować, iż istnieć musi jakieś specyficzne działanie produktów przemiany, inne dla *Paramaecium* i inne dla *Pleurotricha*.

W zgodzie z temi badaniami stoją eksperymenty DOFLEINA ('13) z *Trypanosomami*, które to wiciowce były wciąż przenoszone do świeżych pożywek, przyczem okazało się, że ogromnie wrażliwe na własne produkty przemiany *Trypanosomy* nie zawsze wyraźnie reagują na produkty przemiany innych pasorzytniczych gatunków.

O ile wskazane szkodliwe czynniki przemiany materji usunie się ze środowiska zewnętrznego pierwotniaka przez hodowlę indywidualną we wciąż zmienianych kroplach pożywki, to przy stosunkowo równomiernej podzielności można taką hodowlę prowadzić w ciągu dziesiątków lat, jak to czynili WOODRUFF i METALNIKOW. Nie zanotowali oni żadnych objawów wyczerpania energii życiowej. To też teza WEISMANN, że pierwotniaki są nieśmiertelne, gdyż nie znają śmierci naturalnej, wywołanej czynnikami wewnętrznymi, w dalszym ciągu nie straciła swej aktualności.

Ale we wskazanych pracach rozstrzygała egzystencja i trwanie nieśmiertelne linii ciągłych, nie liczono się z osobnikiem jako takim, który przecież po każdym i w każdym podziale przestaje być sobą, zaś osobniki powstałe z podziału nie są także identyczne z osobnikiem macierzystym. Dwa nowe osobniki podziałowe to dwa odrębne indywidua, bardzo bliskie, a przecież już różniące się od siebie, każdy nowy podział to świeży przyrost różnie indywidualnych.

W ciągu lat ostatnich mamy w tej dziedzinie pewien postęp. W ramach potencjalnej nieśmiertelności pierwotniaków zajęto się kwestją nieśmiertelności pojedynczych osobników, lecz prace są tu bardzo nieliczne. Przedewszystkiem HARTMANN ('22, '24, '28) wychodząc z założenia, że podział i zjawiska przedpodziałowe mogą odgrywać dla pierwotniaka rolę czynników odmładzających, postawił zagadnienie: czy można zastąpić podział przez jakiś inny czynnik, o możliwie zbliżonem znaczeniu, i utrzymać mimo to osobnika przy życiu bez podziału.

Przez stosowanie zranień w określonych odstępach czasu udało mu się zmusić *Stentora*, karmionego zawiesiną *Colpidium*, do każdorazowej regeneracji i do życia bez podziału w ciągu 52 dni, podczas gdy osobnik siostrzany, trzymany w tem samym środowisku, i nie poddawany operacjom, dzielił się, dając w tym czasie 35 pokoleń. Gdy po 52 dniach operacje zostały zaniechane, *Stentor* doświadczalny podzielił się normalnie, zahamowana zdolność podziałowa bynajmniej nie została zniszczona. Analogiczny wynik otrzymał HARTMANN dla wirka, *Stenostomum*, oraz dla ameb, które dzięki amputacji części ciała i regeneracji dały się hodować bez podziału do 4 miesięcy.

W dalszym ciągu w ciekawych pracach GOETSCHA ('21, '22) dla *Metazoa* (*Turbellaria*, *hydrzy*) wyniki powyższe potwierdziły się w całej rozciągłości, pozwalając mówić wspomnianym autorom nie tylko o potencjalnej nieśmiertelności kultury, ale o potencjalnej nieśmiertelności osobnika w odpowiednich warunkach.

Nie ulega wątpliwości, że obserwowanie życia osobnika w ciągu jakiegoś czasu nie uprawnia jeszcze do ostatecznych wniosków, ale wyniki prac HARTMANN i GOETSCHA mogły się stać punktem wyjścia dla dalszych badań. Praca niniejsza przede wszystkim miała na celu stwierdzenie, czy można i na jak długo przedłużyć indywidualne życie *Paramaecium caudatum* bez uciekania się do tak gwałtownego czynnika, jakim jest zmuszanie pierwotniaka do regeneracji, i czy nie należy przytem zwrócić raczej uwagę na dobór odpowiednich warunków zewnętrznych środowiska, które, jak wynika z badań WOODRUFFA i innych, tak ważną odgrywają rolę.

Chodziłoby zatem o dobór takich warunków zewnętrznych, w których pierwotniak mógłby żyć i odżywiać się, lecz nie ulegałby podziałowi.

W trakcie pracy wysunęło się zagadnienie, związane z wynikami badań ROBERTSONA ('21, '22, '24) nad tak zwanym czynnikiem allelokatalitycznym.

W myśl wyników ROBERTSONOWSKICH, podzielność pierwotniaków może ulec wzmożeniu wskutek wydzielania przez nich do środowiska kultury czynnika allelokatalitycznego o charakterze wybitnie chemicznym. Czynniki ten daje się przez specyficzne zabiegi ekstrahować z jednego środowiska i przenosić do drugiego, a dodanie takiego wyciągu do wody destylowanej z pierwotniakami, naogół hamującej podzielność, wzmacnia podzielność w znacznym stopniu. Jako czynnik chemiczny, substancja allelokatalityczna pozwala się koncentrować i rozcieńczać, co w praktyce zostaje osiągnięte w ten sposób, iż w odpowiednich małych kroplach pożywki umieszcza się 1,2, lub więcej pierwotniaków. W myśl wyników ROBERTSONA w badaniach nad *Enchelys* i *Colpidium*, w kroplach 0.08 cm³ pożywki sianowej 1 osobnik po 24 godzinach daje 2, po 48 — 16, zaś 2 osobniki po 24 godzinach dają 3, po 48 godzinach — 120 osobników, czyli pierwotniaki pobudzają się energicznie wzajemnie do podziału.

Fakty te jednak nie zostały potwierdzone przez innych badaczy, jak CUTLER i CRUMP ('23, '25), GREENLEAF ('24, '26) MYERS ('27) oraz GRINWALD ('28), ani dla *Colpidium colpoda*, ani dla *Paramaecium caudatum*, *P. aurelia* i *Pleurotricha*.

Wreszcie wyniki otrzymane przez ROBERTSONA stoją w sprzeczności z przytoczonymi powyżej wynikami WOODRUFFA, gdyż w myśl założeń Robertsonowskich zmniejszenie objętości kropli pożywki winno wzmacniać podzielność, gdy w wynikach zarówno WOODRUFFA, jak i wymienionych przeciwników ROBERTSONA dzieje się wręcz naodwrot.

Ponieważ w pracy niniejszej nie mogłem pominąć tak ważnego zagadnienia, ostatecznie rozdział poświęcam rozpatrzeniu tej

kwestji, tembardziej, że jak się zdaje, wszyscy przeciwnicy ROBERTSONA i on sam pracowali z pożywkami sianowemi, które kryją w sobie bardzo wiele czynników nieoznaczalnych, dzięki ogromnej różnaitości stężenia, zawartości bakteryj, rozmaitej kwasowości i t. p.

W pracach wskazanych autorów nie uwzględniono jednak ani morfologicznej, ani ilościowej strony odżywiania, choćby ilości bakteryj, co, jak wynika z mojej pracy, ma pierwszorzędne znaczenie i decyduje częstokroć o takich, czy innych wynikach doświadczeń.

M e t o d y k a.

Ponieważ w ciągu moich badań byłem zmuszony do operowania bardzo różnaitymi metodami, podam szczegółową metodykę w odpowiednich rozdziałach.

Na zasadzie poprzedniego doświadczenia (CHEJFEC '28) stosowałem karmienie wymoczków czystymi kulturami *Bacterium Coli*, których otrzymanie opisałem przedtem (loc. cit., str. 95). Obliczania bakteryj dokonywałem z pomocą kamery THOMA-ZEISSA, operując w każdym przypadku ściśle określonymi ilościami bakteryj i dokładnie oznaczonymi stężeniami. Pożywkę sianową, stosowaną sporadycznie w poszczególnych doświadczeniach, otrzymywałem z 20 — 25 gramów siana, gotowanego od 30 do 45 minut w 500 cm³ wody. W tych warunkach dominują w pożywce *B. subtilis*. Pożywkę tę stosowałem 24, 48 najdalej w ciągu 72 godzin po przegotowaniu, po uprzednim, odpowiednim dla danych celów rozcieńczeniu. Kultury masowe prowadziłem w dużych 2 litrowych naczyniach, zawierających 1000 cm³ cieczy hodowlanej.

Pojedyńcze pierwotniaki hodowałem na zwykłych szkiełkach wydrążonych w 50 do 200 mm³ cieczy. Szkiełka te z pierwotnikami trzymałem w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej, w poszczególnych przypadkach w termostacie o temperaturze 22 — 23°.

Barwikiem stosowanym przeze mnie we wszystkich badaniach do-rywczych był „Methylgrün“ w 10% kwasie octowym. Niektóre preparaty stałe barwiłem w karminie boraksowym, po utrwaleniu w kwasie pikrynowym.

Pomiary pierwotniaków skuteczniejszałem po utrwaleniu w kwasie pikrynowym, przy pomocy okularu mikrometrycznego.

Oznaczenia stężenia jonów wodorowych dokonywałem metodą kolorymetryczną GILLESPI'EGO.

Pierwotniaki badane pochodziły ze starej dobrze prosperującej kultury laboratoryjnej *Paramaecium caudatum*, hodowanej na pożywce sianowej i bakteryjnej, od której ustawicznie odprowadzałem nowe linje.

Podzielność pierwotniaków w zależności od stopnia stężenia bakteryj w środowisku zewnętrznym.

Ponieważ badania moje miały na celu osiągnięcie takich warunków zewnętrznych, w których mógłbym utrzymać pierwotniaka możliwie najdłużej bez podziału, z wykluczeniem wszelkich objawów depresyjnych, starczych i śmiertelnych, musiałem przede wszystkim stosować takie czynniki, które mogłem stosunkowo najłatwiej i najskuteczniej oznaczać i regulować. Takim czynnikiem był bezsprzecznie pokarm, zaś stosowane przeze mnie pożywki zawiesiny *B. Coli* ułatwiały to zadanie.

Już w mojej poprzedniej pracy ('28) miałem możność wskazać, jak dalece udaje się utrzymać równowagę warunków zewnętrznych w pożywce *B. Coli*, i w jakim stopniu podzielność jest związana z pokarmem i jego stężeniem w poszczególnych objętościach. Ograniczę się obecnie do przytoczenia tabeli I ze wskazanej pracy, uzupełnionej liczbami, odpowiadającymi stężeniu 50 tysięcy bakteryj w mm³. Tabela ta wskazuje na rolę stężenia bakteryj w pożywce, podawanej pierwotniakom, i zależność podziałów od stężenia pożywki. Podkreślić tu muszę pewien szczegół, którego w mojej poprzedniej pracy świadomie nie poruszałem, mianowicie — zwracam uwagę na przyrost liczby pierwotniaków w dobach po sobie następujących w rozmaitem stężeniu. W celu łatwiejszej orientacji tabela II podaje mnożniki, wskazujące przyrost absolutnej liczby pierwotniaków w następujących po sobie okresach dwudobowych w poszczególnych stężeniach *B. Coli*, stosowanych w doświadczeniach, których wyniki zostały objęte tabelą I.

Tabela I.

Ilość osobników *Paramecium* w środowisku *B. Coli* o rozmaitem stężeniu po 2, 4, 6 dniach.
Individuenzahl in verschiedenen B. Coli-Konzentrationen nach 2, 4 und 6 Tagen.

Doby Tagē	Liczba początkowa <i>Ausgangszahl</i>		Zawartość <i>B. Coli</i> w 1 mm ³ pożywki <i>B. Coli-Zahl in 1 mm³ des Mediums</i>									
			25000		50000		75000		125000		175000	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
2	25	25	366	390	323	297	224	262	197	168	127	179
4	25	25	583	567	783	808	1665	1396	1872	2039	2428	2786
6	25	25	486	519	1045	1036	1686	1620	3476	4000	6680	6770

Widzimy, że przyrost liczbowy pierwotniaków (podzielność) jest funkcją przynajmniej dwóch zmiennych, mianowicie: czasu i stężenia podawanej pożywki, o ile oczywiście temperatura jest wartością stałą, co też miało miejsce we wszystkich obserwacjach tego typu, gdyż naczynka z pierwotniakami stale były trzymane w termostacie o temperaturze 22 — 23° C.

Nadmiar pokarmu, wpływający hamująco na podział w ciągu pierwszych 48 godzin, już po czterech dobach umożliwia ogromny przyrost. Dzielące się stopniow^o pierwotniaki, pomnażając swą ilość, zużywają nadmiar pokarmu i wytwarzają optymalną, właściwą dla swej liczby w danym stężeniu bakteryjnym. Ta pomysłowość warunków pokarmowych wyraża się we wzrastającym mnożniku przyrostu liczbowego. Naodwrot, mniejsze ilości po-

Tabela II.

Mnożnik absolutnego przyrostu pierwotniaków po 2, 4, 6 dniach.
Koeffizient des absoluten Zuwachses der Infusorienzahl nach 2, 4 und 6 Tagen.

Doby Tage	Zawartość <i>B. Coli</i> w mm ³ pożywki <i>B. Coli</i> - Zahl in cmm des Mediums				
	25000	50000	75000	125000	175000
2	15.1	12.0	9.7	7.3	6.0
4	1.6	2.5	6.3	10.7	17.1
6	0.8	1.3	1.0	1.9	2.6

karmu, stwarzając optymalne warunki wyjściowe, już po czterech dobach zmieniają się w sposób niekorzystny, a niedostatek pokarmu natychmiast wyraża się w mnożniku przyrostu, który gwałtownie opada, niejednokrotnie znamionując głód. Dla przykładu porównajmy wyniki dla stężenia: 25 tysięcy *B. Coli* w mm³ i stężenia 175 tysięcy *B. Coli* w mm³. W stężeniu pierwszym największy przyrost notujemy w ciągu pierwszych 48 godzin, co wyraża się mnożnikiem 15.1 czyli z 25 osobników otrzymaliśmy po dwóch dniach (25 × 15.1), podczas gdy dla stężenia drugiego tylko (25 × 6), a więc przeszło dwa razy mniej osobników. Ale po czterech dniach wyniki się odwracają: mnożnik dla stężenia pierwszego jest tylko 1.6, gdy dla drugiego 17.1, co w przeliczeniu na liczbę pierwotniaków w pierwszym przypadku daje (25 × 15.1 × 1.6), a w drugim (25 × 6 × 17.1) osobników. Po sześciu dobach różnica na korzyść drugiego stę-

zenia uwydatnia się w dalszym ciągu, charakteryzując się odpowiednio mnożnikami dla mniejszego stężenia 0,8, dla większego 2,6, co w przeliczeniu na liczbę pierwotniaków daje, jak widzimy z tabeli I, stosunek 13:1 na korzyść stężenia większego.

Podobne wyniki otrzymujemy przy obserwacji pojedynczych pierwotniaków na szkiełkach wydrążonych, zawierających po 100 mm³ pożywki *B. Coli* o rozmaitem stężeniu. Oczywiście dla pojedynczych pierwotniaków warunki pokarmowe muszą być odpowiednio dobrane, gdyż, jak wykażę poniżej, zużycie pokarmu nie jest wprost proporcjonalne do ilości pierwotniaków; proporcjonalność tu występująca jest innego typu.

Tabela III.

Podzielność wyizolowanych z kultury osobników na szkiełkach wydrążonych w 100 mm³ pożywki o rozmaitem stężeniu *B. Coli*.

Teilungsrate der aus der Kultur isolierten Individuen auf ausgehöhlten Objektträgern in 100 mm³ Nahrungsfüssigkeit in verschiedenen B. Coli-Konzentrationen.

Ilość <i>B. Coli</i> w 1 mm ³ pożywki <i>B.Coli-Zahl in 1 cmm</i>	Podzielność po godzinach <i>Teilungsrate nach Stunden:</i>				
	0	10	16	24	48
5000	20	20	20	20	25
20000	20	20	30	120	240
40000	20	20	40	130	320
60000	20	20	27	54	168
80000	20	20	27	54	216

Tabela III daje nam obraz podzielności dla wyizolowanych z kultury osobników, hodowanych na szkiełkach wydrążonych w rozmaitem stężeniu pokarmu. Mamy tu wyniki bardzo ściśle obserwowane, dokonywane na oddzielnych pierwotniakach, których podzielność mogłem oznaczać wprost z godziny na godzinę.

W wyniku opisanych w tym rozdziale doświadczeń możemy stwierdzić, że:

1°. Podzielność pierwotniaków jest zależna od stężenia bakterij w pożywce i od czasu, w ciągu którego pierwotniaki w środowisku pożywki pozostają.

2°. Zbyt wielkie stężenia hamują podzielność pierwotniaków i niejednokrotnie oddziałują wprost ujemnie.

3°. Mniejsze stężenia, przekraczające jednak pewne dające się określić minima, o czym jeszcze szczegółowo mówić będę, umo-

żliwiają regularne wystąpienie pierwszych podziałów, lecz w następstwie podzielność opada z powodu zbyt szybkiego wyczerpania pokarmu w środowisku.

Absolutna ilość bakterij pochłanianych przez pierwotniaki.

Dla odtworzenia optymalnych warunków pokarmowych dla *Paramaecium caudatum* nie mogłem poprzestać na stwierdzeniu zależności podziałów od stężenia, musiałem oznaczyć absolutne ilości bakterij pobieranych przez pierwotniaki.

Za punkt wyjścia posłużyły mi następujące liczby teoretyczne: Jeśli średnia długość *B. Coli* wynosi 2 mikrony, szerokość 0.5 mikronów, to przyjmując bakterję za walec o średnicy 0.5 mikronów i tworzącej 2 mikronów oznaczamy jej objętość na 0.39 mikronów³. Z pomiarów, dokonanych na pierwotniakach, średnicę przeciętnego wodniczka możemy oznaczyć jako równą 16 mikronom, możemy więc, przyjmując wodniczek za kulę o promieniu 8 mikronów, obliczyć jej objętość jako 2143.56 mikronów³. Stąd z podzielenia objętości wodniczka pokarmowego przez objętość bakterji otrzymujemy teoretyczną najwyższą ilość bakterij, zawartych w jednym wodniczku, czyli $2143.56 : 0.39 = 5496$ bakterij wypełnia wodniczek pokarmowy. Jeżeli uwzględnimy, że w optymalnych warunkach w ciągu godziny pierwotniak pobiera około 20 podobnych wodniczków, to ilość w ten sposób zużytych bakterij daje się określić jako $5496 \times 20 = 109920$ bakterij na godzinę.

Znając te liczby orjentacyjne zwracamy się do ich odpowiednika doświadczalnego. Aby uzyskać liczby faktyczne, umieszczałem pojedyncze osobniki *Paramaecium caudatum*, dobyte z młodej dobrze prosperującej kultury, w celu pewnego wygłodzenia na 10 godzin w czystej wodzie wodociągowej, poczem przenosiłem je do szkiełek wydrążonych, zawierających po 100 mm³ zawiesiny *B. Coli* o ściśle oznaczonym stężeniu, obejmującym w poszczególnych doświadczeniach od 1200 do 4500 tysięcy bakterij w liczbach absolutnych (od 12 do 45 tysięcy bakterij w mm³).

Po 6 godzinach obliczałem absolutną ilość pozostałych na szkiełku w kropli bakterij z pomocą kamery THOMA-ZEISSA. Różnica liczb bakterij przed i po doświadczeniu, podzielona przez czas trwania doświadczenia wskazywała ilość średnio zużytych

przez pierwotniaka bakteryj w ciągu godziny. Całe doświadczenie obejmowało 130 osobników w 13 serjach po 10 pierwotniaków w każdej. Każda więc liczba tabeli IV jest średnią arytmetyczną dziesięciu obliczeń, zaokrągloną do tysiąca.

Kilkakrotnie powtarzające się obliczenia w tych samych serjach wskazały, że błąd obliczeń nie przekraczał 5000 bakteryj, co wobec liczb otrzymanych jest błędem nieznacznym. Zaznaczyć muszę, że doświadczenia wskazane robiłem w ciągu lata

Tabela IV.

Absolutna ilość bakteryj (w tysiącach), pochłanianych przez pojedyncze pierwotniaki w rozmaitych stężeniach w ciągu godziny.

Die absolute Anzahl (in Tausenden) der von Einzellinfusorien binnen einer Stunde aufgebrauchten Bakterien in verschiedenen Konzentrationen derselben.

Ilość <i>B. Coli</i> w 100 mm ³ pożywki <i>B. Coli Anzahl in 100 mm³</i>	Z tego zużyto w ciągu godziny <i>Davon binnen 1 Stunde aufgebraucht</i>
1200	95
1250	104
1300	83
1500	64
1600	136
1700	120
2200	100
2300	150
2400	183
2700	138
2950	200
3400	195
4500	218

i jesieni w temperaturze pokojowej w najrozmaitszych porach dnia i nocy. Tabela IV podaje otrzymane wyniki. Rzut oka na nią wystarcza do stwierdzenia, że wartości teoretyczne w tym przypadku nie odbiegają zbyt od wartości doświadczalnych. Dla średnich stężeń, nie przekraczających 2.2 miliona bakteryj w 100 mm³ cieczy (22 tysiące w mm³), zużycie bakteryj w ciągu godziny wynosi przeciętnie 100 tysięcy dla każdego pierwotniaka. Dla stężeń wyższych zużycie nie przekracza 218 tysięcy bakteryj na godzinę. Z góry muszę się jednak zastrzec, iż liczby te są nieco wygórowane, gdyż pewna ilość bakteryj w kroplach płasko rozlanych, w miarę ich wysychania, zachodzącego nawet w komorze wilgotnej, osiada na brzegach kropli. Przy opisaney metodzie obliczeń, uwzględniającej liczbę początkową i końcową, zawieszonych w środowisku, po jego wstrząśnięciu bakteryj, owa nieznaną, zresztą bardzo niewielką dla mniejszych stężeń liczbą bakteryj osiadłych figuruje jako spożyta przez pierwotniaki, podnosząc w pewnej mierze obliczoną liczbę bakteryj, zużytych przez pierwotniaka pojedynczego w ciągu godziny. W wyniku, stwierdzić możemy, że liczby doświadczalne nie odbiegają zbyt od teoretycznych, że podniesienie stężenia bakteryj zwiększa odpowiednio ilość bakteryj pobranych przez pierwotniaka, oczywiście w pewnych granicach. Tak więc ilość pobranych dla 2.9, 3.4,

4.5 miliona bakteryj w 100 mm³ cieczy wynosi średnio około 200 tysięcy bakteryj w ciągu godziny. Odpowiednio ilość ginących przez wysychanie bakteryj jest większa, a specjalne obliczenia kontrolne kropli zawiesiny bez pierwotniaków wykazują, że strata przez wysychanie kropli może czasami obejmować do 20% bakteryj, jednak tak wysoki procent zanotowałem tylko w paru sporadycznych przypadkach w bardzo dużych stężeniach bakterijskich. W małych stężeniach pożywki pierwotniaki szybciej wybierają bakterje i dla tej przyczyny brak pierścienia wysychających bakteryj, więc błąd popełniany jest znacznie mniejszy.

Minimalne ilości pożywki wystarczające do skutecznego podziałów.

Znając przynajmniej w przybliżeniu przeciętną liczbę pochłanianych przez pierwotniaka bakteryj w ciągu godziny, mogłem już przystosowywać warunki pokarmowe, licząc się z potrzebami osobnika, i znowu obliczenie teoretyczne stało się punktem wyjścia dla dalszych doświadczeń.

Ponieważ *Paramaecium caudatum* dzieli się raz w ciągu doby, więc uwzględniając ilość zużytej w ciągu godziny pożywki i przyjmując liczbę 100 tysięcy bakteryj, mogłem oznaczyć liczbę bakteryj w pożywce dobowej na $100,000 \times 24 = 2,400,000$ *B. Coli* w 100 mm³ cieczy. Rzeczywiście w takiej pożywce 100% pierwotniaków (trzymanych pojedynczo na szkiełkach wydrążonych) dzieli się nieodwołalnie.

W dalszym ciągu, mając wciąż na celu dążenie do wykluczenia podziałów i jednoczesnego zachowania pierwotniaka przy życiu, począłem stopniowo zmniejszać stężenie podawanej pożywki. Zmniejszenie stężenia przeprowadzałem bardzo systematycznie, umieszczając wciąż nowe serje pojedynczych pierwotniaków na szkiełkach wydrążonych w 100 mm³ ściśle oznaczonej ilościowo pożywki *B. Coli*. Okazało się, że 2.2, 2.0, 1.8, 1.5 i 1.2 milionów bakteryj w 100 mm³ cieczy (22, 20, 18, 15, 12 tysięcy bakteryj w mm³ cieczy) umożliwiają normalną dobową podzielność, jednak stężenie 1.5 miliona *B. Coli* w 100 mm³ w wielu przypadkach jest przełomowe, gdyż aczkolwiek wszystkie pierwotniaki się dzielą, to podział staje się nieregularny.

Wobec tego przystąpiłem do pierwszych eksperymentów, mających na celu utrzymanie pierwotniaków przy życiu bez podziałów.

Nastawiłem 2 serie doświadczeń, z których każda obejmowała 50 osobników *Paramecium caudatum*, pochodzących ze świeżo założonej linii czystej. Pierwotniaki umieszczałem pojedynczo na szkiełkach wydrążonych w 100—150 mm³ pożywki o średnim stężeniu 10 tysięcy *B. Coli* w mm³. Co 24 godziny wszystkie osobniki przenoszone były do świeżego środowiska pokarmowego. Normalnej dobowej podzielności w tych warunkach już zanotować nie można, jednak po 12 dniach najdalej wszystkie pierwotniaki, nie licząc straconych w czasie manipulacji i zmarłych, co razem nie przekraczało 10% ogólnej ilości pierwotniaków badanych, podzieliły się przynajmniej raz, a niektóre od 3 do 5 razy. Oczywiście po zanotowaniu podziału, jednego z osobników siostrzanych natychmiast usuwałem z kropli.

Tabela V.

Losy pojedynczych pierwotniaków na szkiełkach wydrążonych w 100—150 mm³ pożywki o stężeniu 1000—2000 *B. Coli* w 1 mm³.
Verhalten einzelner Infusorien auf aufgehöhlten Objektträgern in 100—150 cmm Flüssigkeit in Konzentrationen von 1000—2000 B. Coli in 1 cmm.

Serja Serie	Podzieliło się z 50 początkowych: Von 50 Ausgangstieren geteilt:					Zginęło Eingegangen
	10 dni 10 Tage	15 dni 15 Tage	20 dni 20 Tage	25 dni 25 Tage	30 dni 30 Tage	
I	30	10	2	2	2	4
II	26	10	4	5	0	5
Razem Zusammen	56	20	6	7	2	9

Aczkolwiek wskazane stężenia bakteryjne pożywki obniżały podzielność, to przecież jej nie wykluczały i okazało się w następstwie, że im dłużej trwało doświadczenie w tych warunkach, tem regularniej dzieliły się pierwotniaki. Zaszło przystosowanie się do podawanej ilości pokarmu i niejednokrotnie w poszczególnych liniach podziały zachodziły raz na 24 lub 48 godzin.

Nie będę opisywał szczegółowo dalszych żmudnych, obejmujących około 300 osobników doświadczeń, wszystkie różniły się od siebie tylko zmniejszonymi stężeniami podawanej pożywki.

Wciąż zmniejszając liczbę bakterij w pożywce, doszedłem do liczb, odpowiadających ilości bakterij, zużywanych przez pierwotniaka w ciągu godziny w warunkach optymalnych, to znaczy—do stężeń 150 do 200 tysięcy bakterij w 100 mm³ cieczy,

czyli do stężeń około 20 do 25 razy mniejszych od optymalnych. W tych warunkach regularna podzielność ulega stosunkowo wielkiemu zahamowaniu, aczkolwiek i tutaj nie zanika zupełnie. *Paramaecium* okazuje zadziwiającą wprost zdolność do ograniczania i ekonomizowania swych potrzeb pokarmowych. Egzystuje w warunkach teoretycznie głodowych, faktycznie umożliwiających mu nie tylko normalną egzystencję, ale nie wykluczających reprodukcję.

Tabela V podaje wyniki dwóch seryj doświadczeń, obejmujących po 50 osobników *P. caudatum* na szkiełkach wydrążonych, w 150 mm³ cieczy o stężeniu 1 do 2 tysięcy *B. Coli* w mm³. Co 24 godziny wszystkie osobniki były przenoszone do świeżego środowiska i odstawiane do kamery wilgotnej, znajdującej się w temperaturze pokojowej od 16 do 22°.

Jak widzimy i w tych warunkach prawie wszystkie pierwotniaki dzielą się, ale podział przy odpowiednim postępowaniu w poszczególnych przypadkach można odsunąć w odstępy miesięczne. Poprzestaną tu jedynie na stwierdzeniu tego faktu, odsuwając omówienie pewnych stron morfologicznych do specjalnego rozdziału.

Maksymalny okres trwania życia pojedynczego osobnika.

Chociaż odsunięcie podziałów w okresy 30-dniowe było już bardzo dodatnim wynikiem, nie mogłem na nim poprzestać, gdyż, jak się miało okazać w trakcie doświadczeń przekonałem, stan pierwotniaków, utrzymanych w ciągu tego miesiąca bez podziałów był najzupełniej zadawalający. Muszą i mogą więc istnieć sposoby, zezwalające na dalsze wydłużenie okresu bezpodziałowego trwania pojedynczego osobnika.

Już w poprzednich doświadczeniach udało się stwierdzić, że mimo bardzo starannie dobieranych warunków zewnętrznych, jednakowych dla wszystkich pierwotniaków serji, jedno się przystosowało inaczej od drugich, stopień zaś wyczerpania życiowej potencji był różny dla różnych pierwotniaków. Szereg obserwacji wskazał, że ponieważ w głównej mierze mam za zadanie przedłużyć życie indywidualne osobnika, winienem metodę hodowli bardziej indywidualnie stosować i traktować każdego osobnika, nie jak cyfrę serji, lecz jak odrębną jednostkę o swoistych właściwościach.

W czasie doświadczeń, objętych tabelą V, mogłem wyróżnić pewne stany pierwotniaków, które są wskaźnikami wzmożonego głodu lub zbliżającej się możliwości podziału. Do takich wskaźników należą: szybkość ruchów pierwotniaków (raczej ogólny stopień ruchliwości), wielkość osobnika, stopień zwakuolizowania protoplazmy i odkształcenie zewnętrznej postaci.

Pierwotniaki o obniżonej potencji życiowej wykazują, wskutek małej ilości wypełnionych zawartością wodniczzków pokarmowych, silne wyjaśnienie i przezroczystość plazmy, są wyraźnie mniejsze i często silniej odkształcone od tych, które wykazują tendencję podziałową. Te ostatnie są wyraźnie bardziej ruchliwe, duże, ciemne, dzięki lepiej wypełnionym wodniczkom pokarmowym.

O ile podawać pokarm przy codziennem odświeżeniu środowiska tylko tym pierwotniakom, których wygląd budzi obawę i wskazuje na stan obniżonej życiowości, zaś pozbawiać świeżej zawiesiny bakteryjnej te, które tego stanu nie wykazują, lub charakteryzują się wzmożoną potencją życiową, można okresy bezpodziałowe przedłużyć.

W nowej serii doświadczeń, obejmującej 50 osobników tabeli VI, zastosowałem metodę niżej przytoczoną.

Zawiesinę bakteryjną przestałem dodawać codziennie przy przenoszeniu pierwotniaków do świeżych kropeł (100 mm³ wody), a czyniłem to w odstępach 4 do 7-dniowych. Pierwotniaki wszystkie co dzień były przenoszone do świeżych kropeł i tylko te otrzymywały pożywkę w dozie nie przekraczającej 2 tysiące bakterij w mm³, których wygląd wzbudzał przypuszczenie, iż znajdują się w stanie obniżonej potencji życiowej (zmniejszona ruchliwość, zmniejszone rozmiary i zwiększona przezroczystość). Jednak i tutaj stopień przystosowania się pierwotniaków do warunków sięga tak daleko, że każde przekroczenie zwykłej dozy pokarmowej, nieznaczna, trudno dająca się uniknąć nadwyżka stężenia bakteryjnego wystarcza za bodziec podziałowy. Aczkolwiek oba osobniki siostrzane po podziale odrazu wykazują stan wielkiego osłabienia, dający się przewyciężyć przez codzienne równomierne dokarmianie, to jednak, mimo, zdawałoby się, nieprzychylnych warunków głodowych, pierwotniaki raczej dzielą się, niż umierają w razie zbyt gwałtownego podniesienia koncentracji podawanej pożywki.

Porównyując wyniki tabeli VI z wynikami tab. V, stwierdzamy, iż opisana metoda przedłuża okres życia bezpodziałowego do 90 dni. W ciągu tego okresu osobniki, pozostające bez podziału, maksymalnie otrzymały pokarm 18 razy w odstępach 2 do 7-dniowych, zależnie od stanu, w jakim się znajdowały. Podziały, zanotowane we wskazanej tabeli, następują zawsze w ciągu pierwszych 48 godzin po dodaniu pokarmu, każdy podział jest tylko oznaką trudności w skalowaniu ilości potrzebnej pożywki, każde najdrobniejsze odchylenie, dające się stwierdzić eksperymentalnie, wywołuje w określonych warunkach doświadczenia podział.

Tabela VI.

Zachowanie się pojedynczych pierwotniaków przy zastosowaniu metody indywidualnego dokarmiania.

Verhalten einzelner Tiere unter Anwendung der Methode der individuellen Ernährung.

Podzieliło się z 50 początkowych: <i>Von 50 Ausgangstieren geteilt:</i>									Zginęło <i>Eingegangen</i>
10 dni <i>10 Tage</i>	20 dni <i>20 Tage</i>	30 dni <i>30 Tage</i>	40 dni <i>40 Tage</i>	50 dni <i>50 Tage</i>	60 dni <i>60 Tage</i>	70 dni <i>70 Tage</i>	80 dni <i>80 Tage</i>	90 dni <i>90 Tage</i>	
10	5	12	1	1	1	3	2	2	13

Wymieranie samoistne, mimo warunków bardzo nieprzychylnych, wyraźnie głodowych, nie przekracza 10% przypadków, pierwotniaki częściej giną w trakcie manipulacji przenoszenia na świeże szkiełka lub w czasie oczyszczania środowiska otaczającego. W 90% przypadków śmierci winę ponosi eksperymentator.

W miarę trwania moich badań, w miarę ulepszania metody, coraz mniejsze ilości pierwotniaków giną, coraz dłuższy okres bezpodziałowy osiągnąć się daje. W ostatniej serji IV, obejmującej tylko 30 wymoczek, postępowałem nieco inaczej. Nie przenosiłem wymoczków do świeżych kropeł na innych szkiełkach, lecz pozostawiałem pierwotniaka na własnym szkiełku, odciągałem tylko codzien cieniutką pipetą ciecz otaczającą, wciąż dodając krople świeżej, czystej wody. Po kilku powtórzeniach tej samej manipulacji pierwotniak znajdował się już w określonej objętości wody wodociągowej, do której dopiero dodawałem zawiesinę bakterij, zupełnie według metody opisanej poprzednio.

Dzięki takiemu postępowaniu straciłem mniejszą liczbę osobników, a okres bezpodziałowy udało się wyciągnąć jeszcze bardziej, t. j. do przeszło 120 dni.

Zakończył tę serję podział osobników 4-miesięcznych, spowodowany błędnem obliczeniem bakteryj; zbyt wielka ilość dodanego pokarmu przyczyniła się do przedwczesnego podziału pierwotniaków. Muszę w tem miejscu podkreślić, iż nadwyżka podanego pokarmu była stosunkowo mała, gdyż przy nadwyżkach zbyt wysokich zamiast podziału mogłaby w tych warunkach wystąpić śmierć.

Pięć osobników wskazanej serji żyło i żyje po dzień dzisiejszy (9.VII,29), a jeden z nich przekroczył prawdopodobnie 180 dni życia, lecz dzięki pewnym błędom w znakowaniu szkiełek nie mogłem tego wyniku z całą pewnością załączyć do tabeli VII, która reprezentuje ostateczne moje wyniki we wskazanych badaniach.

Tabela VII.

Zachowanie się pojedynczych pierwotniaków przy zastosowaniu metody indywidualnego dokarmiania.

Verhalten einzelner Tiere unter Anwendung der Methode der individuellen Ernährung.

Podzieliło się z 25 początkowych: <i>Von 25 Ausgangstieren geteilt:</i>				Zginęło <i>Eingegangen</i>
0—80 dni <i>0—80 Tage</i>	80 dni <i>80 Tage</i>	100 dni <i>100 Tage</i>	120 dni <i>120 Tage</i>	
0	4	8	10	3

W rezultacie stwierdzam, że w doświadczeniach moich dzięki opisanej metodzie hodowli indywidualnej, bardzo zresztą łatwej do naśladowania przy pewnej wprawie, okres bezpodziałowy życia *Paramaecium caudatum* można przedłużyć do 120 dni i więcej przy odpowiednio subtelnej metodyce.

Głód, przerywany okresami niezbyt, jak widzimy, intensywnego karmienia, staje się, jak w doświadczeniach HARTMANN'a ze stentorem i amebami, czynnikiem odmładzającym i regulującym. Pierwotniak żyje, reguluje do pewnego stopnia przemianę energetyczną, zaś nadmiar energii pozyskanej ze świeżo dodanego pokarmu zużywa na wewnętrzną regulację, która z pewnością zachodzić w nim musi w tych warunkach, w sposób bardzo intensywny, wyczerpując zapas energii podziałowej w zupełnie innym kierunku. Być może energia ta idzie na uporządkowanie zachwianej równowagi plazmo-jądrowej, o czem szerzej będę mówił w rozdziale następującym.

Morfologia.

Aby dokładniej zbadać pierwotniaki, którym uniemożliwiłem podział, nastawiłem serję obejmującą kilkadziesiąt osobników, hodowanych w sposób podobny jak *Paramaecia* tabeli VII, poczem w pewnych odstępach czasu utrwaliałem od 5 do 10 osobników i dokonywałem pomiarów oraz analizy mikroskopowej. Krótko dla orientacji podaję wyniki tych obserwacji i pomiarów w tabeli VIII. Obejmuje ona: długość pierwotniaka, wielkość jądra i ilość wodniczków pokarmowych. Stanu plazmy i układu jądrowego (makro i mikro) w tabeli tej nie umieszczam, pozostawiając te sprawy do dalszego omówienia.

Tabela VIII.

Wymiary pierwotniaków utrwalonych w mikronach.
Massen fixierter Infusorien, in Mikronen.

Serja Serie	Pierwotniaki po dniach <i>Infusorien nach Tagen</i>	Długość ciała <i>Körperlänge</i> μ	Długość jądra <i>Kernlänge</i> μ	Ilość wodniczków <i>Vakuolen-Zahl</i>	Stosunek plazmojądrowy P/K <i>Plasma-Kern-Relation</i>
1	0	280	70	12	4.0
2	14	235	80	7	2.3
3	25	245	90	3	2.7
4	50	250	80	5	3.1
5	75	240	85	4	2.8
6	100	240	110	4	2.2

Zwrómy uwagę na pierwotniaki przed doświadczeniem, wydobyte ze zwykłej dość dobrze prosperującej kultury, ale stosunkowo skąpo karmionej.

Długość przeciętna osobnika 280 mikronów¹⁾, długość jądra 70 mikronów. Ilość wodniczków przeciętnie — 12. Po 100 dniach przeciętna długość spada do 240 mikronów, jądro wydłuża się do 110 μ i odpowiednio rozszerza, mikro wyraźnie odsuwa się od makronucleusa, wodniczków 4. We wszystkich przypadkach depresji pierwotniaków i ich obniżonej potencji życiowej stosunek plazmo-jądrowy (stosunek długości ciała do długości jądra) przesuwa się na korzyść jądra.

¹⁾ Cyfry pomiarów zaokrąglone. Błąd średniej wartości w każdej serji pomiarów ± 5 mikronów.

Zdawałoby się więc, iż wszelkie stosunki układają się wyraźnie na niekorzyść pierwotniaka, i taki też wniosek możnaby wyciągnąć, gdybyśmy poprzestali na samych liczbach przytoczonych. Ale porównajmy ze sobą pierwotniaki, pozostające bez podziału w ciągu 14 dni, których długość wynosi 235 mikronów, jądro 80 mikronów, ilość wodniczków 7, z pozostającymi bez podziału 50 dni, o długości 250, jądrze 80 mikronów i ilości wodniczków równej 5. Stosunek długości ciała do długości jądra wynosi dla pierwszych 2.94, dla drugich zaś 3.13, a więc stosunek ten wypada korzystniejszy dla pierwotniaków 50-dniowych.

Rzeczywiście, pierwotniaki tej grupy (4) były utrwalone i zbadane następnego dnia po zasileniu ich wszystkich pożywką, co wpływa odrazu na stosunek plazmo-jądrowy w sensie dodatnim, podnosząc go od 2.7 do 3.1. Zmniejszone rozmiary pierwotniaków i wzrost jądra przy zwakuolizowaniu plazmy i zmniejszonej ilości wodniczków, to typowe, jak wskazują doświadczenia kontrolne, zjawiska głodowe. Pierwotniaki specjalnie głodzone, obserwowane przeze mnie, tak się właśnie zachowują; zjawiska wskazane występują już po 10 najdalej dniach absolutnego głodu, ale o ile po tym czasie stopniowo, bardzo małymi dozami podawano pożywkę, już po 48 godzinach pierwotniaki regulują stan plazmo-jądrowy. W celu ściślejszego zbadania wspomnianego stosunku, wydobywałem z kultury stopniowo i systematycznie wygładzanej (do 14 dni) pewną ilość pierwotniaków i po utrwaleniu kwasem pikrynowym oznaczałem stosunek plazmo-jądrowy P/K. Wynosił on dla pierwotniaków głodzonych 1.2—2. Po przeniesieniu pierwotniaków głodzonych na szkiełka wydrążone w krople czystej wody, do której co parę godzin w ciągu pierwszego dnia dodawałem nieznaczne ilości świeżej pożywki, już po 3 dniach występuje 25% podziału. Stosunek P/K dla pierwotniaków popodziałowych wynosi 4.1, 50% niepodzielonych wykazuje stosunek P/K — 2.5 — a po 24 godzinach dzielą się i te pierwotniaki, wykazując P/K — 4.0, pozostałe 25% pierwotniaków zginęło.

Jeżeli teraz z serji, objętej tabelą VIII, wydobyć kilkanaście pierwotniaków, pozostających bez podziału od 25 do 50 dni i wykazujących średnio stosunek P/K — 2.7, i przenieść wskazane pierwotniaki do kropeł ze świeżą pożywką, której koncentrację stopniowo podnosić, to już po 48 godzinach podzieli się prawie 50% pierwotniaków, wykazując po podziale stosunek P/K = 3.8 —

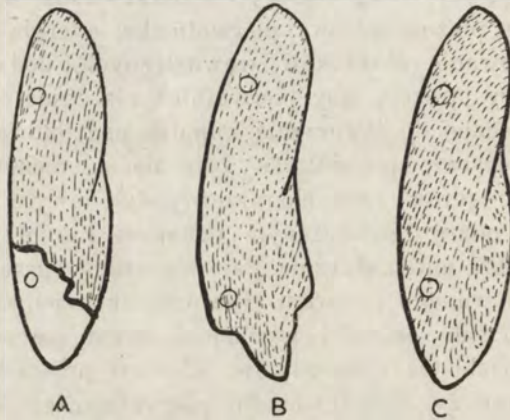
— 4.1, zaś najdalej po 72 godzinach dzielą się pozostałe, dając stosunek $P/K = 3.5 - 4.4$, a jeśli je wciąż dostatecznie starannie pielęgnować, po następnych podziałach stosunek P/K przekracza 5.

Stwierdzam więc w wyniku, że przerost jądra, silna wakuolizacja, mała ilość wodniczków wskazują jedynie na stan podglodowy pierwotniaków, który, o ile go nie przeciągać nadmiernie, nie tylko nie przybiera objawów patologicznych, ale — jak widzimy — zastępuje do pewnego stopnia regulację podziałową, wykluczając ją jako taką. Świeży i w ograniczonej ilości pokarm reguluje stan plazmo-jądrowy pierwotniaka, energia zużywa się na uporządkowanie stosunków wewnętrznych, dodawane dozy pokarmowe wystarczają, aby pierwotniak nie zginął z głodu, ale nie są dostateczne do stworzenia impulsu podziałowego.

W następstwie pierwotniak żyje nadal, niekorzystny stosunek plazmo-jądrowy ma charakter podglodowy. Przy dostatecznym i w miarę dostarczonym pokarmie nie przybiera form patologicznych i automatycznie daje się usunąć przez podniesienie ilości podawanego pokarmu. Pierwotniak dzieli się wówczas, a świeżo powstałe osobniki wyglądem swym nie przypominają zupełnie, iż pochodzą z osobników, które w przerachowaniu na normalny okres życia indywiduum pierwotniaczego byłyby formami metuzalemowemi.

Na dwa niezmiernie ciekawe przypadki muszę jeszcze zwrócić w tym rozdziale uwagę. Podczas manipulacji przenoszenia pierwotniaków z jednego szkiełka na drugie w czasie odświeżania środowiska, przerwałem pierwotniaka, pozostającego bez podziału 24 dni, powyżej tylnego wodniczka tętniącego w sposób, wskazany na rysunku (rys. 1 A, p. str. 94). Ponieważ po tym przypadkiem uszkodzeniu pierwotniak nie zginął od razu, a ruch rzęsek trwał nadal jeszcze po godzinie, przenieśliem zranionego do świeżej kropli i szkiełko odstawiłem do komory wilgotnej. Już po 24 godzinach, ku memu zdumieniu, pierwotniak zaczął regenerować, wykazując charakterystyczny dorost stożkowy i odkształcenia jak wskazuje rys. 1 B. Nie dodając więc większej dozy pożywki niż uprzednio, pozostawiłem pierwotniaka w tem samym środowisku. Regulacja kształtu występowała bardzo powoli, ale już po 7 dniach pierwotniak niczem się nie różnił od innych osobników (rys. 1 C). Straciłem go po 18 dniach, podczas oczyszczania szkiełka wydrążonego, na którym się znajdował.

W drugim analogicznym przypadku pierwotniak został uszkodzony igłą zaostrzoną w podobny sposób, regeneracja zupełna wystąpiła w ciągu 5 dni. Po zakończonej regeneracji, w celu zbadania, czy podzielność uległa jakiemuś specjalnemu zaburzeniu, dodałem zwiększoną ilość pożywki, i po 24 godzinach pierwotniak podzielił się normalnie, a utrwalone osobniki siestrzane zupełnie niczem się nie różniły od innych, powstałych z podziału normalnych pierwotniaków.



Rys. 1. Regeneracja *Paramecium caudatum*.
Fig. 1. Regeneration von *Paramecium caudatum*.

We wszystkich innych przypadkach odpowiednie uszkodzenie pierwotniaków dla braku właściwej aparatury nie mogło być powtórzone, nie mogłem więc stwierdzić ostatecznie, czy brak podzielności wyzwała nową, mało znaną dla *Paramecium caudatum* właściwość regeneracji. Dwa przypadki w sensie statystycznym nie są oczywiście przekonywujące, a jednak nie mogę ich pominąć. *Paramecium caudatum* uchodzi za formę naogół nie regenerującą. Opisywane odosobnione przypadki potworności i regeneracji CALKINSA ('26) przypominają niezawsze to, cośmy zwykli pod regeneracją rozumieć. W moim przypadku mogłem obserwować, niestety dwukrotnie tylko, ale zato niemal klasyczne przebiegi regeneracji, gdyż w dwóch przypadkach jedynie udało mi się pierwotniaki zranić.

Sądzę, iż sprawa ta wymaga specjalnego zbadania z zastosowaniem aparatury mikrurgicznej. Metodyka i sposób postę-

powania wynika w dostatecznej mierze z niniejszego opisu. Wystarczy pierwotniaki utrzymać 20 do 30 dni bez podziału, a po odpowiednim uszkodzeniu ciała w rozmaitych punktach stwierdzić, czy w rzeczywistości przynajmniej pewien procent pierwotniaków zregeneruje w tych warunkach.

Kultury masowe.

Gdy poznałem warunki hodowli pojedynczych wymoczków bez podziału, przystąpiłem do badań nad kulturami masowymi i od razu zetknąłem się z ogromnymi trudnościami metodycznymi.

Trzy kwestje wysunęły się na plan pierwszy.

1°. Jakimi ilościami pożywki bakteryjnej trzeba operować w masowej kulturze.

2°. Jakie powinno się dobrać stężenie pierwotniaków.

3°. Jak utrzymać kulturę w możliwie jednostajnych warunkach zewnętrznych.

Zdawałoby się, że punkt pierwszy nie powinien nastęrczać żadnych trudności, wystarczy poprostu po dokonaniu obliczenia pożywki dla jednego pierwotniaka, pomnożyć cyfrę bakterij stosowanych w hodowlach indywidualnych przez ilość pierwotniaków w kulturze masowej. Jednak sprawa okazała się daleko trudniejsza. Od razu po pierwszych próbach stanąłem wobec zagadnienia kilku zmiennych, o czym już poprzednio wspominałem. Jak miałem możność zaznaczyć w najgrubszych zarysach, ilość zużywanego pokarmu, stężenie pożywki i ilość cieczy decydują o podzielności, ale wykrycie spólczynnika proporcjonalności na drodze rozważań teoretycznych nie jest możliwe.

Parę prostych doświadczeń, mających swe źródło w rozważaniach teoretycznych, zilustruje to.

O ile 1,000,000 bakterij w cm^3 ($1000/\text{mm}^3$) jest ilością pożywki graniczną, hamującą z pewnością podziały pierwotniaka pojedynczego, umieszczonego w 100 mm^3 cieczy, to podobnie nie wystąpią podziały, jeśli naprzykład hodować 20 — 25 pierwotniaków w odpowiednio pomnożonych ilościach bakterij i cieczy.

Wydobyłem z normalnej, młodej, dobrze prosperującej, ale słabo karmionej kultury *Paramaecium caudatum* pewną ilość pierwotniaków i po przemyciu ich wodą wodociągową na szkiełkach zegarkowych, odliczyłem po 20 — 25 osobników do 2 — 2.5

cm³ pożywki o średnim stężeniu 1000 bakteryj w mm³. Po 72 godzinach obliczałem, po utrwaleniu całej zawartości naczynka, ilość osobników. Tabela IX podaje otrzymane wyniki. Jak widzimy, we wszystkich naczynkach wystąpił przeciętnie raz podział, obejmujący wszystkie prawie pierwotniaki. Więc w stężeniu bakteryj, w którym pojedyncze pierwotniaki napewno się nie dzielą, kultura masowa wykazuje podziały wymoczków.

Ten nieco nieoczekiwany wynik, którego wyjaśnienie zostało zdobyte dopiero w związku z dalszemi badaniami, od razu wskazał mi trudności, z jakimi wypadnie się zmierzyć w trakcie hodowli kultur.

Tabela IX.

Podzielność w próbnym kulturach masowych w minimalnych stężeniach pożywki.

Teilungsrate in schwach besiedelten Kulturen bei geringer Nahrungsmenge.

Ilość cieczy w naczynku w cm ³ <i>Flüssigkeitsmenge in ccm.</i>	Stężenie <i>B. Coli-Konzentrat.</i>	Ilość osobników <i>Individuenzahl</i>	
		Początkowo <i>Anfangs</i>	po 72 godz. <i>nach 72 Stunden</i>
2	1000/mm ³	20	31
2.5		25	42
2.5		25	50
2		20	27
2		20	35
2		20	34
2		20	40
2		20	40

Opierając się na wynikach prac ROBERTSONA, mogłem przypuszczać, iż czynnik allelokatalityczny nie pozostaje tu bez wpływu. Wychodząc więc z tego niepotwierdzonego, jak się okaże później, przypuszczenia, postanowiłem operować kulturami większemi pod względem objętości cieczy. Założone w tym celu młode kultury, stosunkowo gęste, rozcieńczyłem do 1000 cm³, utrzymując średnio wyjściowe stężenie pierwotniaków na 10 osobników w 1 cm³, sądząc iż w tych warunkach czynnik allelokatalityczny ograniczę w sposób wystarczający przez nadmiar cieczy i małą ilość osobników.

W tych warunkach, t. zn. w 1000 cm³ cieczy kultury o stężeniu średnim 10 pierwotniaków w cm³ i stężeniu pożywki od 1 do 1.5 tysiąca bakteryj w mm³, podzielność zostaje zahamowana w sposób widoczny.

Oczywiście powstała odrazu trudność dodawania świeżych ilości pożywek i odświeżania środowiska.

Po całym szeregu doświadczeń przekonałem się, iż stosunkowo najrówniejsze warunki zostaną osiągnięte (w sensie zahamowania podziałów), o ile pokarm świeży będę podawał w odstępach 4 — 5-dniowych z założeniem, że wszystkie bakterje, zawarte w kulturze i zdadne na pokarm, zostały zużyte przez pierwotniaki. Praktycznie przeprowadzałem to w ten sposób, że do 1000 cm³ kultury dodawałem parę centymetrów bardzo stężonej zawiesiny bakteryjnej, by po rozmieszaniu otrzymać średnio, sprawdzane z pomocą kamery THOMA, stężenie 1 — 1.5 tysięcy bakteryj w mm³. Codziennie obliczałem stężenie pierwotniaków w cm³ cieczy za pomocą wyskalowanej pipety, biorąc po gruntownym, ale niezbyt gwałtownym wymieszaniu kultury 10 prób centymetrowych z rozmaitych poziomów. Po obliczeniu, pierwotniaki wydobyte wracały do kultury. Dla dokonywania pomiarów wypadło pewną ilość pierwotniaków utrzymywać, musiałem je więc w kulturze badanej zastępować innymi, branymi z kultury siostrzanej, analogicznej i jedynie w tym celu hodowanej. Wprowadziłem przeto do środowiska kultury badanej pewną ilość pierwotniaków kultury siostrzanej, liczba w ten sposób przetranslokowanych pierwotniaków nie przekroczyła jednak tysiąca. Metoda ta ma pewne braki, ale był to jedynie możliwy sposób nie uszczuplenia przez utrwalenie stałej liczby pierwotniaków w kulturze.

Dodawanie świeżej wody skutecznie codziennie, korzystając z pewnej bardzo pomyślnej okoliczności. Jak się okazało, pierwotniaki w takich kulturach, o ile je zostawia się w spokoju, zbierają się w dole, częstokroć wprost osiadają tuż koło dna, prawdopodobnie wskutek większego stężenia *B. Coli*, które, jak wykazały doświadczenia kontrolne, zwłaszcza w większych stężeniach opadają ku dołowi.

Niezależnie od przyczyn, powodujących takie zachowanie się pierwotniaków, fakt opisany umożliwiał mi odciąganie z naczynia cieczy w małych, do 20 cm³ wynoszących dozach, dających się kontrolować, czy nie zawierają pierwotniaków, oraz umożliwiał mi odświeżanie stopniowe i dosyć równomierne kultury.

Pomiary stężenia jonów wodorowych, dokonywane metodą kolorymetryczną, pozwalały mi stwierdzić pod tym względem stosunkowo dużą jednorodność warunków, objawiającą się także w stałej liczbie pierwotniaków, występujących w kulturze.

Tabela X zamyka wyniki prawie dwumiesięcznej hodowli w tych warunkach. Zaznaczam, że miałem do czynienia w ciągu moich badań z kulturami, prowadzonymi w ten sposób 3 miesiące i dłużej, lecz zaniechać musiałem hodowlę wprost dla braku czasu, gdyż prowadzenie kultur w tych warunkach wymaga tylu zabiegów, że z ledwością mogłem wszystkie codzienne obserwacje, obliczenia i sprawdzenia dokonywać. W tabeli X podaję wyniki dla kultury, oznaczonej cyfrą 1^a, gdyż w ciągu owych dwóch miesięcy najściślejsze i najbardziej drobiazgowo obliczenia tej właśnie kultury dotyczyły.

Widzimy, że w okresie od 6/IX do 29/X w kulturze 1^a utrzymała się stała liczba pierwotniaków w granicach od 7 do 12 osobników w cm³. W tem liczba 12 wystąpiła 2 razy, 11—4 razy, 10—9 razy, 8—10 razy, 7—7 razy. Jeśli zważymy, że liczba wyjściowa stężenia początkowego 6/IX wynosiła 10 osobników w cm³, zaś liczba końcowa 29/X wynosiła 9 osobników w cm³ i jeśli uwzględnimy możliwość ewentualnego błędu, wynikającego z dziesięciu obliczeń, musimy się zgodzić, iż stałość liczby pierwotniaków w tych warunkach jest bardzo znaczna. Nie da się tego powiedzieć ani o wielkości pierwotniaków, ani o rozmiarze jąder, ani też o ilości wodniczków, skala wahań tutaj jest o wiele wyższa. Długość pierwotniaków waha się od 185 do 300 mikronów. Wielkość jądra w granicach od 50 do 100 mikronów. Ilość wodniczków od 0 do 14. Jednak dokładniejsza analiza wskazuje, iż wszelkie nie występujące u normalnych osobników objawy, poza cechami podglądowymi, nie mają żadnego patologicznego charakteru. Każda świeża porcja pożywki normalizuje stan pierwotniaków, następujący po niej okres czterodniowy jest okresem stopniowo wzmagającego się stanu podglądowego, objawiającego się w zmniejszeniu osobnika, w przeroście jądra, odsunięciu mikro od makro (nie we wszystkich przypadkach) i w zmniejszającej się ilości wodniczków, ale ponowne dodanie pożywki zawsze reguluje stan pierwotniaków.

Czy jednak mógłbym orzec z pewnością, iż stała liczba pierwotniaków w kulturze utrzymuje się dzięki nieśmiertelności i brakowi podziałów?

Kategorycznie zdecydować tego nie mogę, mogę jedynie stwierdzić, że w ciągu wielu miesięcy, pomimo częstych, długotrwałych, w różnych porach dokonywanych obserwacji kultur,

Tabela X.

Zachowanie się pierwotniaków w kulturach masowych o małej zawartości pokarmu.
Das Verhalten der Infusorien in Massenkulturen bei spärlicher Ernährung.

Data Datum	Ilość <i>B. Coli</i> w 1 mm ³ <i>B. Coli-Zahl</i> in cmm	Ilość pierwot. w cm ³ <i>Infusor.</i> <i>Zahl in</i> <i>1 cmm</i>	Długość ciała <i>Körperlänge</i> μ	Długość jądra <i>Kernlänge</i> μ	Ilość wodnicz- ków <i>Vakuolen-Zahl</i>	pH
6. IX	1500	10	230 — 265	65 — 90	6 — 7	7.8
7 "		11	245 — 270	60 — 75	4 — 6	
8 "		10	245 — 250	50 — 80	4 — 6	
9 "		9	240 — 280	80 — 90	4 — 6	
10 "		8	205 — 275	55 — 80	3 — 6	
10 "	1500	8	205 — 275	55 — 80	3 — 6	7.6
11 "		7	220 — 265	65 — 85	4 — 8	
12 "		6	225 — 265	75 — 85	4 — 7	
13 "		7	225 — 270	65 — 95	3 — 7	
14 "	1500	7	225 — 250	60 — 80	4 — 7	7.6
15 "		7	225 — 250	60 — 80	3 — 7	
16 "		7	225 — 250	60 — 80	3 — 7	
17 "		9	230 — 250	60 — 80	3 — 8	
18 "	1500	8	240 — 265	55 — 75	5 — 6	7.7
19 "		8	250 — 260	55 — 75	5 — 6	
20 "		9	225 — 270	60 — 85	3 — 4	
21 "		10	240 — 265	65 — 80	3 — 4	
22 "	1500	9	225 — 275	60 — 85	4 — 7	7.8
23 "		9	225 — 265	65 — 80	3 — 4	
24 "		9	235 — 245	65 — 80	2 — 5	
25 "		9	230 — 285	60 — 85	2 — 3	
26 "	1500	8	225 — 260	60 — 85	4 — 9	7.8
27 "		10	225 — 275	65 — 85	4 — 7	
28 "		9	225 — 265	75 — 30	2 — 4	
29 "	1500	9	250 — 260	75 — 90	3 — 4	7.7
1. X		8	230 — 270	75 — 90	2 — 4	
2 "		9	215 — 260	75 — 85	2 — 4	
3 "	1500	8	235 — 275	75 — 85	0 — 4	7.8
4 "		9	225 — 270	70 — 80	2 — 6	
5 "		8	240 — 275	75 — 95	2 — 6	
6 "	1500	9	230 — 315	75 — 105	4 — 9	7.9
8 "		9	260 — 280	75 — 80	4 — 6	
9 "		11	240 — 260	70 — 80	3 — 5	
10 "	1500	10	250 — 300	60 — 80	4 — 9	7.7
11 "		12	250 — 300	70 — 85	4 — 8	
12 "		10	250 — 300	70 — 85	5 — 7	
13 "		10	260 — 230	75 — 85	5 — 5	
14 "	1500	9	215 — 270	50 — 75	2 — 3	7.6
15 "		9	235 — 275	60 — 85	2 — 4	
16 "		8	260 — 275	65 — 80	2 — 4	
17 "	1300	7	225 — 245	75 — 80	1 — 3	7.9
18 "		7	225 — 250	75 — 80	1 — 3	
19 "		9	185 — 250	65 — 75	1 — 3	
20 "	1200	10	230 — 275	75 — 85	7 — 10	7.9
21 "		9	235 — 280	75 — 80	6 — 9	
22 "		8	240 — 250	60 — 90	4 — 5	
23 "	1300	8	240 — 275	75 — 100	5 — 7	7.8
24 "		9	260 — 275	75 — 100	6 — 8	
25 "		12	250 — 270	70 — 90	6 — 8	
26 "	1500	10	250 — 275	50 — 75	3 — 4	7.8
27 "		11	245 — 275	65 — 80	3 — 4	
28 "		9	250 — 260	70 — 90	3 — 5	

ani razu nie natrafiłem na dzielącego się pierwotniaka. Mimo to jednak możliwe, iż pewna ilość pierwotniaków mogła się podzielić, aczkolwiek nie dała się zaobserwować.

Chcąc wytłumaczyć stałość liczby pierwotniaków w mojej kulturze i przyjmując istnienie pewnej podzielności, musiałbym przyjąć, że dokładnie tyleż pierwotniaków dziennie dzieli się, ile umiera. Ponieważ takie przypuszczenie jest mało prawdopodobne, muszę jedynie wnosić, że jeśli w mojej kulturze w ciągu dwóch miesięcy dokładnych obserwacji pierwotniaki dzieliły się i umierały, to przypadki te mogły objąć tak minimalne ilości osobników, że nie mogły one zaważyć na szali obliczeń statystycznych. Pewną niewyraźną wskazówkę istnienia słabej podzielności dają liczby tabeli X w okresie od 6 do 18.X.28 roku.

Przy oczyszczaniu środowiska kultury i zmianie naczyń dn. 29.X wskutek rozlania kultury straciłem pewną ilość pierwotniaków, wobec czego przerwałem badania, ale posłużyłem się kulturą pozostałą do dalszych celów, nadając jej cyfrę II^a. Uży-

Tabela XI.

Liczebność kultury masowej przy zwiększonej ilości pokarmu.
Infusorienzahl der Massenkultur bei erhöhter Nahrungsmenge.

Data <i>Datum</i>	Ilość <i>B. Coli</i> w 1 mm ³ <i>B. Coli Zahl</i> <i>in 1 cmm</i>	Ilość osob- ników w 1 cm ³ <i>Individuen-</i> <i>Zahl in</i> <i>1 cmm</i>	Długość ciała <i>Körperlänge</i>	Długość jądra <i>Kernlänge</i>	Ilość wodnicz- ków <i>Vakuolen-Zahl</i>	pH
1. XI	2500	6	225 — 250	75 — 80	1 — 3	7.8
2 "		8	230 — 250	70 — 75	7 — 10	
3 "		10	235 — 250	70 — 75	20 — 28	
4 "		18	235 — 250	65 — 75	10 — 15	
5 "		21	250 — 280	65 — 85	8 — 10	
6 "	2500	20	250 — 280	60 — 80	3 — 12	7.8
7 "		23	225 — 245	55 — 85	4 — 10	
8 "		20	200 — 250	70 — 85	9 — 14	
9 "		20	230 — 270	70 — 90	9 — 15	
10 "		19	250 — 275	55 — 90	10 — 13	
11 "	2600	20	250 — 310	80 — 105	7 — 11	7.7
12 "		19	275 — 300	75 — 100	7 — 15	
13 "		19	275 — 300	75 — 100	6 — 10	
14 "		18	250 — 300	70 — 90	8 — 12	
15 "		19	250 — 320	70 — 105	9 — 10	
16 "	2500	19	250 — 320	75 — 90	9 — 12	7.8
17 "		18	250 — 310	75 — 90	8 — 12	
18 "		17	250 — 300	70 — 100	6 — 11	
19 "		20	250 — 300	70 — 95	7 — 9	
		19	250 — 305	75 — 90		
20 "	2600	19	250 — 300	70 — 80	7 — 13	7.8
21 "		19	245 — 305	85 — 100	8 — 11	
22 "		18	230 — 300	70 — 90	8 — 11	
23 "		20	250 — 300	75 — 95	5 — 10	
24 "		21	250 — 315	75 — 90	6 — 9	

łem jej do stwierdzenia, jak się zachowa liczba pierwotniaków, jeśli podwoić stężenie podawanej pożywki. Jak się okazało, przy zdwojonem stężeniu pożywki efekt był prawie natychmiastowy.

Tabela XI ilustruje dosadnie plastykę liczebności pierwotniaków w kulturze. Podniesienie stężenia podawanej zawiesiny bakteryjnej podnosi podzielność, osiąga ona pewne maksimum,

Tabela XII.

Zależność liczby pierwotniaków w kulturze od stężenia pożywki.
Infusorienzahl der Massenkultur in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge.

Data Datum	Ilość <i>B. Coli</i> w 1 mm ³ <i>B. Coli Zahl</i> in 1 cmm	Ilość osob- ników <i>Individuen</i> <i>Zahl</i> in 1 cmm	Długość ciała <i>Körperlänge</i> μ	Długość jądra <i>Kernlänge</i> μ	Ilość wodnicz- ków <i>Vakuolen Zahl</i>
1. I	1500	9	240 — 275	70 — 90	3 — 7
2. "		8	240 — 270	70 — 90	3 — 8
3. "		9	240 — 260	60 — 90	0 — 7
4. "	1500	12	200 — 255	50 — 90	3 — 7
5. "		13	230 — 290	60 — 100	4 — 7
6. "	1500	12	225 — 260	75 — 90	4 — 6
7. "		13	225 — 270	55 — 90	2 — 4
8. "	1600	11	225 — 260	65 — 80	2 — 7
9. "		11	200 — 270	65 — 90	2 — 5
10. "	3400	13	200 — 265	55 — 80	6 — 8
11. "		17	210 — 265	55 — 75	6 — 8
12. "		18	225 — 265	70 — 90	2 — 9
13. "	3400	32	230 — 265	60 — 75	4 — 8
14. "		32	215 — 265	75 — 100	4 — 6
15. "		28	215 — 240	70 — 100	2 — 3
16. "	3600	31	215 — 290	60 — 90	8 — 10
17. "		31	215 — 250	60 — 90	8 — 14
18. "		36	205 — 245	70 — 100	6 — 8
19. "		36	205 — 245	75 — 100	5 — 8
20. "	6000	38	200 — 275	50 — 75	12 — 17
21. "		43	235 — 275	60 — 75	8 — 14
22. "		42	225 — 275	60 — 80	5 — 8
23. "	4000	44	225 — 260	60 — 75	4 — 10
24. "		40	210 — 250	50 — 75	4 — 11
25. "		40	200 — 250	70 — 80	8 — 10
26. "		33	225 — 250	65 — 100	6 — 8
27. "	4000	31	225 — 250	65 — 80	8 — 10
28. "		26	250 — 265	75 — 80	5 — 6
29. "		25	225 — 245	70 — 75	5 — 6
30. "		25	225 — 250	50 — 60	5 — 6
31. "	6000	25	220 — 260	60 — 80	8 — 12
1. II		30	220 — 260	75 — 90	2 — 4
2. "		42	220 — 250	50 — 60	2 — 5
3. "	10000	37	255 — 235	60 — 100	7 — 14
4. "		36	235 — 300	60 — 100	8 — 10
5. "		30	240 — 300	60 — 90	6 — 7
6. "		28	240 — 320	80 — 110	2 — 4

poczem następuje spadek, ale ostatecznie ustala się liczba pierwotniaków wyższa od wyjściowej dwu-, a nawet trzykrotnie.

Jeszcze wyraźniej zależność ilości pierwotniaków w kulturze od pokarmu obrazuje tabela XII, gdzie każdej zmianie stężenia pożywki w pewnych granicach towarzyszy zmiana liczebności pierwotniaków. W pewnych granicach, o ile bowiem pierwsze nadprogowe stężenia oddziałują bardzo energicznie na przyrost liczby pierwotniaków, o tyle dalsze okazują się coraz mniej skuteczne. Pierwotniaki poprostu „immunizują się“, nie odpowiadają na nowe przyrosty bakterij w pożywce. O ile w granicach stężeń 1.5 do 4 tysięcy bakterij w mm^3 pierwotniaki reagują w kulturze bardzo żywo, o tyle na dalsze zmiany stężenia w granicach od 4 do 6 tysięcy bakterij w mm^3 stają się prawie nieczułe, a wyższe stężenia, poczynają, jak wiadomo, w tych warunkach wogóle oddziaływać deprimująco na liczebność pierwotniaków w kulturze. Powrót do niskich stężeń bakteriujnych natychmiast odzwierciadla się w liczbie pierwotniaków, przyczem spadek jest bardzo gwałtowny. Wskazuje to na szybkie wymieranie pierwotniaków, przywykłych już do wysokiego stężenia pożywki bakteriujnej.

Kultura oznaczona cyfrą III^a posłużyła mi do wskazania różnic między kulturami, prowadzonymi w powyższy sposób, a kulturami zwykłymi, prowadzonymi na pożywce sianowej. Do 900 cm^3 kultury dodałem 10/II około 100 cm^3 pożywki sianowej zwykłej, przygotowanej w sposób opisany w części metodycznej i odrazu mogłem zaobserwować działanie karmienia pożywką tego typu.

Jak wynika z tabeli XIII, liczebność wyjściowa pierwotniaków po 15 dniach osiąga maksimum 150 osobników w cm^3 . Potem następuje wymieranie pierwotniaków i po miesiącu, t. j. 13.III, jest już tylko 15 osobników w cm^3 , ale powtórne dodanie pożywki znowu gwałtownie podnosi podzielność. Pożywka sianowa nie jest wielkością stałą, rozwój bakterij postępuje w myśl krzywej parabolicznej, co zresztą wynika także z szeregu prac VIEWEGERÓW ('18, '21, '22), równolegle postępuje przyrost liczby pierwotniaków, ilość wodniczków pokarmowych w nich zawartych i stosunek plazmo-jądrowy.

W kulturach, oznaczonych cyframi I^a i II^a, nie podobnego nie spostrzegamy. Odpowiednio dobrana stałość warunków, stałość stężenia bakterij w środowisku, decyduje o utrzymaniu

tempa życiowego i rozwojowego na pewnym poziomie. Okres życia pojedynczego pierwotniaka przedłuża się w sposób nieproporcjonalnie wielki do czasu trwania normalnego indywiduum w pożywce sianowej.

Jeżeli fakty z hodowli indywidualnej nie zawsze w najprostszy sposób wiążą się z wynikami uzyskanymi w doświadczeniach, opartych na hodowli kultur masowych, to jednak z całą pewnością stwierdzić możemy, iż sobie nie przeczą.

Tabela XIII.

Zachowanie się pierwotniaków w kulturach po dodaniu pożywki sianowej 10/II i 15/III.
Das Verhalten der Infusorien in Kulturen nach Heuinfusion-Zugabe am 10/II und am 15/III.

Datum Datum	Ilość osobników Individuen Zahl in 1 cmm	Długość ciała Körperlänge μ	Długość jądra Kernlänge μ	Ilość wodniczki pokarmowych Nahrungsvakuolen Zahl
10. II	22	275 — 310	80 — 100	10 — 14
12 "	33	275 — 320	70 — 80	10 — 14
14 "	43	275 — 300	70 — 90	10 — 15
16 "	55	275 — 300	70 — 80	16 — 24
18 "	79	300 — 320	70 — 90	10 — 15
20 "	105	260 — 280	65 — 75	10 — 17
22 "	126	260 — 350	75 — 105	17 — 20
24 "	140	290 — 335	60 — 95	15 — 16
26 "	150	280 — 315	70 — 90	15 — 20
28 "	150	280 — 315	70 — 90	15 — 20
3. III	126	300 — 335	70 — 90	14 — 15
5 "	120	280 — 335	60 — 80	7 — 16
7 "	110	245 — 270	60 — 85	3 — 8
9 "	100	225 — 245	70 — 105	3 — 6
11 "	52	225 — 240	70 — 115	2 — 4
13 "	15	190 — 240	80 — 112	
15 "	15	250 — 280	70 — 105	3 — 7
18 "	13	250 — 290	70 — 100	3 — 10
20 "	17	280 — 350	70 — 80	10 — 12
22 "	29	285 — 340	50 — 85	12 — 14
24 "	36	260 — 315	55 — 80	12 — 18
26 "	41	255 — 315	60 — 65	13 — 17
28 "	68	245 — 230	70 — 80	13 — 20
30 "	93	270 — 290	75 — 85	12 — 22

Doświadczenia WOODRUFFA, stwierdzające, że warunki zewnętrzne tylko i jedynie kierują losem linii, pozwalają sobie, opierając się na moich wynikach, potwierdzić w całej rozciągłości i posunąć się o krok dalej w twierdzeniu, iż istnieją i można dobrać takie warunki zewnętrzne egzystencji pojedynczej komórki pierwotniaczej, że regulacja podziałowa nie będzie, jak sądzi

HARTMANN, jedyną formą trwania komórki. W warunkach bezpodziałowych uda się tak dostosować środowisko otaczające, iż nastąpi całkowita równowaga między asymilacją i dysymilacją, tak że system komórkowy może zyskać warunki nieśmiertelności w najpełniejszym tego słowa znaczeniu w odpowiednio postawionym eksperymencie.

Czynnik allelokatalityczny Robertsona.

Wyniki doświadczeń, przedstawionych w tabeli IX, nie dały się początkowo pogodzić z wynikami hodowli pierwotniaków indywidualnych.

Przypominam, iż w stężeniu obejmującym 1000 bakteryj w mm^3 cieczy podzielność dla pojedynczego pierwotniaka w 100 mm^3 takiej pożywki zostaje zahamowana, a przy odpowiednim postępowaniu daje się odsunąć o całe 120 dni i więcej. Nie ulega także wątpliwości, iż we wskazanej ilości pożywki pierwotniak znajduje się w warunkach podglodowych, ilość dostarczonej w tak skąpej porcji pokarmu energii jest niewystarczająca do pobudzenia podziałowego. Jeśli jednak zmienimy nieco doświadczenie, powiększając ilość pierwotniaków do 20 — 25, odpowiednio ilość cieczy do 2 — 2.5 cm^3 , a ilość bakteryj do miliona w cm^3 , co w przeliczeniu na jednego pierwotniaka daje warunki prawie te same co w hodowli indywidualnej, podzielność w takiej kulturze występuje i obejmuje w okresie 72 godzinnym prawie wszystkie osobniki.

Czyli — warunki zmieniły się faktycznie, aczkolwiek liczbowo nie uległy dla poszczególnych osobników żadnej zmianie. Najwidoczniej w kulturze, obejmującej 25 pierwotniaków, wystąpił nowy czynnik, nieobecny w hodowli pojedynczych pierwotniaków na szkiełkach wydrążonych.

Z konieczności szukałem wyjaśnień w czynniku allelokatalitycznym ROBERTSONA. W myśl założeń tego autora, wyciąg z kulturki małych, w których pierwotniaki się podzieliły, dodany do innych świeżo założonych kulturki, winien oddziaływać jako czynnik wzmagający podzielność. W próbach dokonanych przeze mnie, podobnego zadziałania stwierdzić nie mogłem. W wielu przypadkach środowisko stare, w którym już trzymano pierwot-

niaki, oddziaływało raczej szkodliwie na środowisko kulturki świeżej, branej do doświadczenia. Ponieważ mogłem przypuszczać, że pewne szkodliwe substancje toksyczne, wydzielone przez bakterje, lub też ich produkty przemiany ujemnie wpływają na wynik, musiałem się uciec do innej metody, także zresztą stosowanej przez ROBERTSONA i jego przeciwników, z tą różnicą, iż badacze ci pracowali z nieokreślonymi ilościowo i jakościowo pożywkami sianowymi, ja zaś stosowałem pożywkę *Bacterium Coli* ściśle oznaczoną.

W celu zbadania podzielności pierwotniaków w związku z istnieniem czynnika allelokatalicznego ROBERTSONA, nastawiłem szereg jednakowych naczynek 15 cm³ (po 10 każdej kategorii) i umieszczałem w każdym w 2 cm³ pożywki o znanym stężeniu po 1, 2 i 4 pierwotniaków, a po 3 i 4 dniach obliczałem pierwotniaki pozostałe z podziału w każdym naczynku.

W pierwszych trzech serjach (I, II, III) ilość pokarmu dodawałem proporcjonalną do ilości pierwotniaków w naczynku. W serji IV, V, VI i VII we wszystkich naczynkach, niezależnie od ilości pierwotniaków, była taka sama ilość pokarmu, rozmaita dla każdej serji.

Tabela XIV (str. 106) podaje otrzymane wyniki. Liczby w rubryce „ilość osobników końcowa“ są średnimi dziesięciu wyliczeń po odrzuceniu ułamków (liczby obok w nawiasach wskazują cyfry teoretyczne, właściwe normalnym podziałom — teoretycznym). Podzielność w tych warunkach (ilości pokarmu teoretycznie wystarczające do wywołania podziału) w szerokich granicach jest niezależna od ilości pierwotniaków oraz bakteryj w 2 cm³ cieczy. Ilości ostateczne osobników w naczynkach są prawie proporcjonalne do liczby wyjściowej pierwotniaków i zgadzają się w przybliżeniu z odpowiednimi liczbami teoretycznymi dla normalnej podzielności *Paramaecium caudatum*.

Więc w doświadczeniach I i II we wszystkich czterech naczynkach, zawierających razem 10 osobników, po 4 dobach znalazłem, zamiast 160 teoretycznych w jednym przypadku 164, a w drugim 161 osobników. W doświadczeniu III, zamiast teoretycznych 96 znalazłem faktycznie 91 osobników. Dopiero w serjach IV, V i VI liczby faktyczne znajdowanych osobników są mniejsze od teoretycznych, ale pierwotniaki w tych naczynkach miały odpowiednio mniejsze ilości pokarmu, gdyż jak wiadomo

ilość progowa pokarmu dla jednego osobnika w warunkach optymalnych wynosi 1.5 tysięcy bakteryj w mm³; oczywiście, takich ilości bakteryj ani 3, ani 4 pierwotniaki, zamknięte w naczyniach w 1 cm³ cieczy, nie miały. Dzieliły się wprawdzie, gdyż podziały zachodzą także w stężeniach mniejszych, ale podziel-

Tabela XIV.

Podzielność pierwotniaków w naczyniach, zawierających początkowo 1 do 4 osobników.

Die Teilungsrate in Gefässen die Anfangs 1 bis 4 Individuen enthielten.

Serja Serie	Absolutna liczba bakteryj w naczyniu w tysiącach <i>Die absolute Bakterien-Zahl im Gefäss, in Tausenden</i>	Czas trwania doświadczenia w dniach <i>Die Dauer des Experimentes in Tagen</i>	Ilość osobników w naczyniu <i>Individuenzahl im Gefäss</i>	
			Początkowa <i>Anfangszahl</i>	Końcowa <i>Endzahl</i>
I	6000	4	1	17 (16)
	12000		2	22 (32)
	18000		3	58 (48)
	24000		4	67 (64)
II	6000	4	1	15
	12000		2	25
	18000		3	43
	24000		4	78
III	5000	4	1	15 (16)
	10000		2	26 (32)
	15000		3	50 (48)
IV	5000	4	1	17
			2	27
			4	44
V	4000	4	1	14
			2	20
			4	50
VI	2000	4	1	12
			2	17
			4	30
VII	18000	3	1	7 (8)
			2	18 (16)
			4	27 (32)

ność ich jest wyraźnie zahamowana. Więc w IV doświadczeniu z 4 wyjściowych, zamiast teoretycznych 64, znajdujemy 44 osobniki, w V — 50, a w VI, gdzie ilość pokarmu jest bardzo mała, znajdujemy tylko 30 osobników.

Aczkolwiek w warunkach tych doświadczeń mamy w pewnych granicach niezależność podziału od ilości pokarmu, to prze-

cież oczywisty brak pokarmu odrazu obciąża podzielność, czynnik allelokatalityczny w tych doświadczeniach także się nie ujawnia, chociaż nie wynika stąd jeszcze, że jest nieobecny.

Po ściślejszej analizie tych wyników powstało przypuszczenie, czy nie dałoby się odwrócić w pewnym stopniu zagadnienie pożywki, mianowicie—czy pierwotniaki nie wydzielają do środowiska pewnych produktów przemiany, któreby oddziaływały na bakterje, wywołując ich podział, w wodzie wodociągowej dla *B. Coli* naogół zahamowany.

Tabela XV.

Zachowanie się bakteryj w kulturach 2 cm³ pod wpływem wyciągów z kultur *Paramaecium*.

Das Verhalten der Bakterien in 2 ccm.—Kulturen unter dem Einfluss der Auszüge aus *Paramaecium*-Kulturen.

Serja Serie	Liczba kropeł Tropfenzahl		Liczba bakteryj w tysiącach Bakterienzahl in Tausenden	
	Odwirowanej kultury Abzentrifugierter Kulturflüssigkeit	Wody Wasser	Początkowa Ausgangszahl	Końcowa Endzahl
I	0	8	4000	3700
	2	6		3000
	4	4		4600
	8	0		3300
II	0	7	2000	1300
	3	4		1450
	5	2		1000
	7	0		1400
III	0	6	18000	15200
	2	4		15000
	4	2		14000
	6	0		13300

Aby poznać wpływ pierwotniaków na zachowanie się bakteryj w środowisku pożywki, przeprowadziłem następujący szereg doświadczeń.

Po bardzo intensywnym odwirowaniu kultury z pierwotniakami nieco wygłodzonymi, w których ilość bakteryj jest minimalna, tak by nie wpływała na wynik obliczeń, dodawałem określone ilości cieczy tej kultury do naczynek z bakterjami, zawierającymi określoną ich ilość. Po 3—4 dniach obliczałem bakterje raz jeszcze. Załączona tabela XV wskazuje otrzymane wyniki. Stwierdzamy z niej, że wyciąg z kultury oddziałuje na bakterje

raczej szkodliwie, aczkolwiek zaznaczyć muszę, że w czystej wodzie wodociągowej w poszczególnych przypadkach pewna ilość *B. Colt* ginie także. W każdym razie o jakimkolwiek zwiększeniu ilości bakterij w środowisku kulturek z tabeli XIV pod wpływem pierwotniaków mowy być nie może.

Należało następnie doświadczenie przeprowadzić w warunkach jeszcze bardziej zbliżonych do doświadczeń Robertsonowskich. Nastawiłem więc w tym celu szereg szkiełek wydrążonych i do kropeł jednakowych, obejmujących 50 mm³ o stężeniu 15—20 tysięcy bakterij w mm³, wpuszczałem 1 lub 2 pierwotniaki, poczem obliczałem ilość osobników po 24 i po 48 godzinach.

Tabela XVI.

Podzielność 1 i 2 pierwotniaków na szkiełkach wydrążonych i w rurkach.

Die Teilungsrate von 1 und von 2 Infusorien auf ausgehöhlten Objektträgern und in Röhren.

Po godzinach Nach Stunden	Ilość pierwotniaków — <i>Paramacienzahl</i>																				
	Początkowo <i>Anfangs</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2					
24	Szkiełka wydrążona <i>Ausgehöhlte Objektträger</i>	4	3	2	2	2	2	2	2	2	4	7	4	4	4	5	6	4	4	3	
	Rurki <i>Röhren</i>	1	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	3	4	4	5	4	4	4	
48	Szkiełka wydrążona <i>Ausgehöhlte Objektträger</i>	4	2	2	4	4	4	2	4	4	4	8	8	8	7	6	6	5	5	8	8
	Rurki <i>Röhren</i>	4	4	4	4	3	3	2	4	2	2	8	8	7	7	8	6	6	8	8	8

Ponieważ w tak małych kroplach wysychanie jest bardzo intensywne, drugą serję doświadczeń nastawiłem w rurkach szklanych otwartych o średnicy 2 mm, które wypełniłem 50 mm³ pożywki o stężeniu 18 tysięcy bakterij w mm³, zawierającej 1 lub 2 pierwotniaki. Wyniki otrzymane jednak nie różniły się prawie od wyników poprzednich doświadczeń, co uwidocznia tabela XVI. Możemy znowu stwierdzić na jej podstawie, że tempo podzielności pozostaje niezmienione zarówno dla jednego, jak i dla dwóch pierwotniaków. Obserwacje ROBERTSONA, dokonane nad *Enchelys* i *Colpidium*, dla *Paramacium* nie potwierdzają się.

Aby zamknąć tę grupę doświadczeń pozostało mi jeszcze zbadać, w jakim stopniu wykorzystują środowisko kropli poje-

dyńcze, a w jakim liczniejsze pierwotniaki. Sporządziłem zawiesinę z bardzo dobrze i równomiernie rozartego indygo, po którego sfracjonowaniu oznaczałem stężenie zawiesiny, otrzymanej za pomocą kamery THOMA-ZEISSA, podobnie jak to czyniłem dla bakteryj. Na szkiełkach wydrążonych w kroplach 100—150 mm³ zawiesiny o oznaczonym stężeniu umieszczałem 1, 2, 3 lub 4 pierwotniaki na czas od 25 do 60 minut, poczem utrwaliałem zawartość szkiełka i obliczałem utworzone przez *Paramaecia* wodniczki pokarmowe, wypełnione przez zawiesinę indygo. Analogiczne doświadczenia przerobiłem z pierwotniakami, zamkniętymi w rurkach o średnicy 2 mm i długości 30 mm, ustawionych nieruchomo, lub na klinostacie, obracającym się z szybkością 2—4 obrotów na minutę. Wyniki tych doświadczeń zawiera tabela XVII. Serje I, II, III, IV, V i VI obejmują pierwotniaki na szkiełkach wydrążonych w kroplach płasko rozlanych. Serja VII, VIII i IX obejmuje pierwotniaki w rurkach pionowych nieruchomych, pozostałe serje w rurkach obracających się na klinostacie.

Na szkiełkach wydrążonych i w mniejszym stopniu w rurkach nieruchomych pojedynczy osobnik pobiera mniej zawiesiny, niż dwa w tych samych warunkach. Okazuje się, że para pierwotniaków lepiej wyzyskuje środowisko, niż pierwotniak pojedynczy, oczywiście w przypadku, gdy nic nie mąci spokoju środowiska. Na klinostacie różnica wskazana zanika, a jednocześnie wyniki klinostatowe tłumaczą całość zjawiska.

Cząsteczki indygo są stosunkowo ciężkie i opadają na dno, ruch pierwotniaka w naczynkach nieruchomych jest jedynym czynnikiem mieszającym środowisko. Oczywiście w warunkach kropli dwa pierwotniaki dokładniej i intensywniej mieszają środowisko, niż jeden; więcej cząsteczek jest zawieszonych w cieczy, mniej opada i to właśnie staje się przyczyną intensywniejszego pobierania zawiesiny. Różnice te są małe, a jednak dostrzegalne w statystycznym obliczeniu. (Każda liczba tabeli XVII jest średnią conajmniej 10 do 15 obliczeń). Na klinostacie wskutek ustawicznego ruchu cząsteczek jeden pierwotniak pobiera podobnie jak dwa, trzy, czy cztery.

Powstaje więc przypuszczenie, wymagające zresztą bardzo subtelnie przeprowadzonych doświadczeń, że lepsza w pewnych przypadkach podzielność dwóch pierwotniaków na szkiełkach jest wynikiem nie czynnika allelokatalitycznego, lecz wprost lepszego

Tabela XVII.

Pobieranie indygo przez 1, 2, 4 *Paramecia* w kropkach i w rurkach.Die Aufnahme einer Indigo-Suspension von 1, 2, 4 *Paramecien* in Tropfen und in Röhren.

№ seria <i>Serie</i>	Minuty <i>Minuten</i>	Liczba cząstek indygo <i>Körnchenzahl von Indigo</i>	Ilość cieczy <i>Flüssig- keitsmenge</i>	Ilość osob- ników <i>Individuen- zahl</i>	Ilość utworzo- nych wodnicz- ków <i>Anzahl gebilde- ter Nahrungs- vakuolen</i>	
Płaskie kropki <i>Flache Tropfen</i>	I	10000/mm ³	100mm ³	1	11.6	
				2	16.0	
				4	17.1	
				5	15.2	
	II	60	10000	100	1	12.4
					2	15.1
III	50	40000	100	1	13.8	
				2	15.0	
IV	45	10000	100	1	10.0	
				2	12.0	
V	25	10000	100	1	8.9	
				2	11.0	
VI	60	15000	100	1	12.4	
				2	12.6	
				3	15.0	
Rurki pionowe nieruchome <i>Vertikale unbewegliche Röhren</i>	VII	45	10000	100	1	10.0
					2	12.5
					3	11.2
VIII	60	20000	150	1	14.8	
				2	13.9	
				3	17.1	
IX	60	15000	100	1	13.2	
				2	14.0	
				3	14.2	
X	45	10000	100	1	14.4	
				2	14.0	
				3	13.8	
XI	40	10000	150	1	13.2	
				2	12.0	
				3	12.0	
XII	40	10000	100	1	13.2	
				2	12.0	
				3	12.3	
XIII	60	20000	100	1	13.8	
				2	13.0	
XIV	60	20000	100	1	18.5	
				2	18.9	
XV	85	20000/mm ³	100mm ³	1	20.6	
				2	18.1	
				3	18.6	
				4	19.1	

wyzyskania środowiska pokarmowego kropli. Dzięki temu ta sama ilość pokarmu, pozornie potrzebna do podziału jednemu pierwotniakowi, może się także okazać wystarczająca dla dwóch, gdyż dwa osobniki, dzięki mieszaniu środowiska, dokładniej i lepiej mogą wybrać stosunkowo ciężkie bakterje, opadające na dno. W tem świetle pobieranie pokarmu przez większą ilość pierwotniaków w określonych objętościach może być znacznie intensywniejsze, niż w przypadku jednego osobnika.

Fakt ten wyjaśnia wiele spraw, dotyczących wyników tabeli XIV, gdzie w serjach poszczególnych stopień podzielności pozostawał mniej więcej stały, pomimo różnej ilości bakteryj, przypadających na jednego osobnika. W tym przypadku mieliśmy jednak naogół stosunkowy nadmiar pokarmu. Inaczej przedstawia się sprawa w doświadczeniach objętych tabelą IX (str. 96), gdyż tam absolutna ilość bakteryj w odniesieniu do jednego osobnika była tak mała, że w kulturach indywidualnych wstrzymywała ona podział przez 120 dni. Mimo to pierwotniaki dzieliły się. Dopiero następne doświadczenia przynoszą tu pewne wyjaśnienie.

Aby się ostatecznie przekonać, czy zawsze pierwotniaki się zachowują tak, jak objęte wynikami tabeli IX, postawiłem nową serję doświadczeń, kierując się nieco inną metodą.

Z kultury masowej, utrzymanej w warunkach bezpodziałowych, do której dnia 30/III dodano pożywkę o stężeniu 1.6 tysięcy *B. Coli* w mm^3 , dnia 2/IV wydobyłem 15 cm^3 cieczy z pierwotniakami, które rozmieściłem w 5 naczyniach po 2 cm^3 i w 5 naczyniach po 1 cm^3 . Liczba pierwotniaków wyniosła 18 osobników w cm^3 . Naczynka zakorkowane watą po dwóch dniach zostały otwarte, ich zawartość utrwalona i zbadana. Wyniki tych doświadczeń w tabeli XVIII są oznaczone serją A. W analogiczny sposób postępowałem w serji B i C, z tą różnicą, że pierwotniaki serji B były umieszczone w naczynkach w dniu ponownego dodania pożywki do całej kultury macierzystej, t. j. 6/IV, a w serji C — dwa dni później.

Widzimy z liczb tabeli, że stałość warunków i stopień podzielności, a raczej brak podzielności we wszystkich serjach, naogół pozostają te same. Stopień zmienności nie przekracza granic, opisanych dla kultur 1000 centymetrowych, chociaż warunki w tym przypadku podobne są do tych, w jakich znajdowały się pierwotniaki, objęte tabelą IX.

W tej próbie wykrycia ściślejszych zależności między czynnikami zewnętrznymi, przede wszystkim pokarmem, t. j. jego ilością, a trwaniem życia indywiduum pierwotniaczego powstaje dziedzina nowych zupełnie możliwości. Okres życia pojedynczego osobnika w specjalnie dobranych warunkach daje się ogromnie wydłużyć. 120 dni życia jednego pierwotniaka wydaje się okresem zawrotnie długim, dającym w przeliczeniu na normalną podzielność potężną ilość osobników, których masa substancji żywej miliony razy przekroczyłaby masę pojedynczego osobnika, a przecież — jak wynika z moich doświadczeń — 120 dni nie jest kresem życia osobnika. HARTMANNOWSKIE *Stentory* i *Ameby*, przeżywające wskutek regeneracji po zranieniach bez podziału w ciągu 50 dni, *Hydry* z badań GOETSCHA nad nieśmiertelnością *Metazoa* pozostają pod tym względem w tyle.

Czynnikiem przedłużającym życie indywiduum jest nietyle pokarm, ile właściwie pewien niedostatek pokarmu. Zwolniona przemiana, pewne obniżenie energetyki procesów życiowych i to okres życia wydłuża się ogromnie. Niskie natężenie procesów życiowych, powolna regulacja stosunków wewnętrznych bez pomocy tak gwałtownego środka, jakim jest podział, działa odmładzająco.

Wyniki moich doświadczeń pozwalają sądzić, iż możliwe jest uzyskanie takich warunków zewnętrznych, w których życie komórki pierwotniaczkiej da się przedłużyć jeszcze bardziej, niż dotąd. Śmierć indywidualna w tych warunkach odsunie się nieograniczenie i kto wie, czy nie zostanie w swej dzisiejszej postaci wyparta w odpowiednio postawionym eksperymencie, potwierdzając w ten sposób ostatnio wypowiedziane przez METALNIKOWA ('24) twierdzenie o nieśmiertelnej potencji komórki w najwęższym znaczeniu, stojącej u podstaw życia organicznego.

W świetle wyników tej pracy nie znajdujemy potwierdzenia dla istnienia ROBERTSONOWSKIEGO czynnika allelokatalitycznego w hodowlach *Paramecium caudatum*. W tej mierze wyniki moje pokrywają się z wynikami przeciwników ROBERTSONA, przede wszystkim z wynikami DONALDA W. CUTLERA i LETTICE MAY CRUMP, GREENLEAFA, GRINWALDÓWNY i MYERSA. Nie mogę tylko zgodzić się z tym ostatnim, gdy kategorycznie stwierdza,

iż przemywanie pierwotniaków pozostaje bez wpływu na ich dalsze zachowanie się. W doświadczeniach moich, zobrazowanych w tabeli IX, mogłem stwierdzić, że w pewnych warunkach ten czynnik może odegrać swoją rolę.

Dlaczego czynnika ROBERTSONOWSKIEGO nie udało się wykryć nikomu prócz YOCOMA ('28), na to pytanie trudno odpowiedzieć. Prócz *Enchelys*, także dla *Colpidium* ROBERTSON notuje występowanie czynnika allelokatalitycznego, ale CUTLER i CRUMP po powtórzeniu jego doświadczeń nad temi wymoczkami doszli do wniosku, że 1, 2, 3 i 4 osobniki w rozmaitych ilościach cieczy i różnem stężeniu pożywki wykazują naogół stałą proporcjonalną podzielność, co stoi w zupełnej sprzeczności z twierdzeniem ROBERTSONA i całkowicie pokrywa się z mojami wynikami dla *Paramaecium caudatum*.

Pozostaje założyć, że pożywka Robertsonowska posiadała jakieś specyficzne własności, aczkolwiek żadnych specjalnych danych w tej mierze w pracach jego, ani w pracach YOCOMA nie znajdujemy. Raczej, porównywując otrzymane przez niego liczby podzielności z liczbami POPOFFA ('24) i SPEKA ('19), charakteryzującymi działanie bodźców stymulacyjnych, szczególnie przez tych autorów badanych, odnosi się wrażenie jakiejś zbieżności między czynnikiem allelokatalitycznym a bodźcem stymulacyjnym. Ten ostatni jest wynikiem zadziaływania pewnych jonów na pierwotniaki w ciągu jakiegoś czasu, niejednokrotnie bardzo krótkiego, w wyniku czego podnosi się znacznie stopień podzielności, podobnie jak to się dzieje w doświadczeniach ROBERTSONA. Oczywiście jest to tylko przypuszczenie.

Streszczenie.

1°. Podzielność *Paramaecium caudatum* jest zależna od stężenia bakteryj w pożywce i od czasu, w ciągu którego pierwotniaki w środowisku pożywki pozostają.

2°. Zbyt wielkie stężenia hamują podzielność pierwotniaków i mogą oddziaływać ujemnie.

3°. Ilość pobranych przez pojedynczego pierwotniaka bakteryj w ciągu godziny jest proporcjonalna do stężenia zawiesiny bakteryjnej i wynosi około 100—150 tysięcy bakteryj na godzinę w stężeniach optymalnych.

4°. Optymalna ilość pożywki dobowej dla osobnika *Paramaecium caudatum* wynosi 2.5 miliona bakterij w 100 mm³ cieczy (25 tysięcy w mm³).

5°. Przy stopniowym obniżaniu stężenia bakterij, pierwsze nieregularności podziału występują w koncentracji 1,500,000 bakterij w 100 mm³.

6°. Przy systematycznym i powolnym obniżaniu stężenia pożywki zachodzi pewne przystosowanie się pierwotniaków, dzięki czemu podzielność dobową, bardzo nawet regularną, udaje się utrzymać także dla mniejszych, niż w punkcie 5°, stężeń bakteryjnych.

7°. W stężeniu 150 — 200 tysięcy w 100 mm³ (1.5 — 2 tysięcy w mm³) podzielność dobowa zanika, okres życia osobniczego pozwala się przedłużyć w pewnych przypadkach do 30 dni.

8°. *Paramaecium caudatum* okazuje jednak dużą zdolność ograniczania swych potrzeb pokarmowych i może w ciągu dłuższego czasu egzystować w odpowiednich warunkach głodowych.

9°. Dzięki metodzie hodowli indywidualnej w określonych ilościach pożywki, dodawanej według potrzeby, udaje się okres bezpodziałowy życia pojedynczych pierwotniaków przedłużyć do 120 i więcej dni.

10°. Czynnikiem, odmładzającym i regulującym stosunki wewnętrzne w pierwotniaku w moich doświadczeniach, jest jedynie takie lub inne stężenie pożywki, lub jej niewystarczające ilości, uniemożliwiające normalną podzielność.

11°. Pierwotniaki, którym uniemożliwiono podziały, wykazują stosunek plazmo-jądrowy taki sam, jak pierwotniaki głodzone, po każdym dodaniu pożywki stosunki powracają do normy, tak samo, jak u pierwotniaków głodzonych. Innych specyficznie patologicznych objawów niema.

12°. Świeży, w ograniczonej ilości podany pokarm reguluje stan plazmo-jądrowy pierwotniaka nie dzielącego się, energia zużywa się prawdopodobnie na uporządkowanie stosunków wewnętrznych, dodawane dozy pokarmowe wystarczają, aby pierwotniak nie zginął z głodu, ale nie są dostateczne do stworzenia impulsu podziałowego.

13°. W dwóch przypadkach, gdy pierwotniaki, utrzymane bez podziału, udało się uszkodzić, zaszła regeneracja.

14°. W kulturach masowych o objętości 1000 cm³ cieczy i stężeniu bakteryjnym 1.5 miliona w cm³ udaje się utrzymać

stałą liczbę pierwotniaków średnio 10 w cm^3 w ciągu 2 — 3 miesięcy. W okresie tym nie zaobserwowano nowych podziałów. Ewentualny procent podziałów i śmierci jest zupełnie minimalny.

15°. Podniesienie stężenia pożywki podnosi stężenie pierwotniaków, obniżenie stężenia obniża stężenie pierwotniaków w kulturze, oczywiście w pewnych określonych granicach.

16°. O ile w granicach stężeń 1.5 — 4 milionów bakteryj w cm^3 pierwotniaki w kulturze reagują bardzo żywo przez podział, o tyle dalsze zmiany stężenia w granicach od 4 — 6 milionów w cm^3 nie przynoszą w tym względzie żadnych zmian.

17°. W pożywkach sianowych utrzymanie stałego stężenia pierwotniaków nie daje się urzeczywistnić. Ilość pierwotniaków postępuje za przyrostem bakteryj i z ich obniżeniem opada w myśl prawidłowej krzywej parabolicznej.

18°. Istnieją więc i można dobrać takie warunki zewnętrzne egzystencji pojedynczego pierwotniaka, oraz częściowo i w masie pierwotniaków, że regulacja podziałowa nie będzie jedyną formą przeżycia komórki. System komórkowy może zyskać warunki nieśmiertelności w odpowiednio postawionym eksperymencie.

19°. W małych ilościach pożywki, wystarczających do wywołania podziału, dzielą się 1, 2 lub 4 pierwotniaki w tem samym tempie.

20°. Na szkiełkach wydrążonych i w rurkach pionowych nieruchomych w dostatecznych ilościach pożywki 1 i 2 pierwotniaki dzielą się jednakowo szybko, czynnik allelokatalityczny nie ujawnia się.

21°. W zawiesinach indygo dwa pierwotniaki w pewnych warunkach tworzą większą ilość wodniczków, niż pojedynczy.

22°. W zawiesinach indygo, zamkniętych w rurkach umieszczonych na klinostacie, pobieralność zawiesiny przez 1 i 2 pierwotniaki jest taka sama, wskutek równomiernego mieszania zawiesiny.

23°. Lepsza podzielność 2 pierwotniaków w zawiesinach bakteryjnych częściowo może być wynikiem lepszego wykorzystania środowiska pokarmowego przez 2 osobniki, niż przez 1.

Piśmiennictwo.

- Calkins G. N.** 1911. Effects produced by cutting *Paramecium* cells. Biol. Bull. **21** (36). **Calkins G. N.** 1926. Biology of the Protozoa. Philadelphia. **Chejfec M.** 1928. On the nuclear reorganisation in *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Experimentalis. **2** (89). **Cutler D. W. L. M. Crump.** 1923. The rate of reproduction in artificial culture of *Colpidium colpoda*. Bioch. Journ. **11** (174). **Cutler D. W. a. L. M. Crump.** 1923. The rate of reproduction in artificial culture of *Colpidium colpoda*. Part II. Bioch. Journ. **17** (878). Part III. Bioch. Journ. **18** (905). **Cutler D. W. a. L. M. Crump.** 1925. The influence of washing upon the reproductive rate of *Colpidium colpoda*. Bioch. Journ. **19** (450). **Doflein F.** 1913. Die Unsterblichkeit im Tierreich. Freiburg. **Doflein F.** 1919. Das Problem des Todes und der Unsterblichkeit bei den Pflanzen und Tieren. Jena. **Grinwald E.** 1928. Recherches sur les facteurs du développement des cultures de microorganismes. L'action de la substance allelocatalytique apparaitelle dans les cultures du *Colpidium colpoda* Ehrbg? Acta Biol. Experimentalis. **3** (81). **Goetsch W.** 1921. Beiträge zum Unsterblichkeitsproblem der Metazoen. Teil I. Biol. Zentralbl. **41** (374), Teil II. *ibid.* **42** (231), Teil III. *ibid.* **42** (278). **Greenleaf W.** 1924. The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction of Protozoa. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **21** (405). **Greenleaf W.** 1926. The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction in infusoria. Journ. Exper. Zool. **46** (143). **Hartmann M.** 1922. Über den dauernden Ersatz der ungeschlechtlichen Fortpflanzung durch fortgesetzte Regenerationen. Biol. Zentralbl. **42** (364). **Hartmann M.** Der Ersatz der Fortpflanzung von Amöben durch fortgesetzte Regeneration. Arch. Protistenk. **49** (447). **Hartmann M.** 1926. Über experimentelle Unsterblichkeit von Protozoen-Individuen. Naturwissenschaften. Jg. **14**, H. **19** (433). **Hartmann M.** 1928. Der Ersatz der Fortpflanzung von *Amoeba proteus* durch fortgesetzte Regenerationen. Zool. Jahrb. Abt. f. Zool. u. Physiol. d. Tiere. **45** (973). **Hertwig R.** Über Korrelation von Zell- und Kerngrösse. Biol. Zentralbl. **23** (49). **Metalnikov S.** 1924. Sur l'immortalité des animaux unicellulaires. Bulletin de l'Institut Leshaft. **9** (1). **Metalnikov S.** 1924. Immortalité et rejuvenissement dans la biologie moderne. Paris. **Myers E. C.** 1927. Relation of density of population and certain other factors to survival and reproduction in different biotypes of *Paramecium caudatum*. Journ. Exp. Zool. **49** (1). **Peters A.** 1906. Chemical studies on the cell and its media. Amer. Journ. of Physiol. **17** (443). **Popoff M.** 1924. Über die Beschleunigung der Teilungsrate von *Paramecium caudatum* durch Zellstimulierende Mittel. Biol. Zentralbl. **44** (87). **Robertson T. B.** 1921. Experimental studies on cellular multiplication. I. The multiplication of isolated infusoria. II. The influence of mutual contiguity upon reproductive rate and the part played therein by the X substance in bacterised infusions which stimulate the multiplication of infusoria. Bioch. Journ. **15** (595). **Robertson T. B.**

1922. Reproduction in cell communities. Journ. of Physiol. **16** (404). **Robertson T. B.** 1923. The chemical basis of growth and senescence. New-York. **Robertson T. B.** 1924. Allelocatalitic effect in cultures of *Colpidium colpoda* in hay infusions and syntetic media. Bioch. Journ. **18** (1240). **Robertson T. B.** 1924. The influence of washing upon the multiplication of isolated infusoria and upon allelocatalitic effect in cultures initially containing two infusoria. Austr. Journ. of exp. biol. and med. Science. **1** (151). **Rubner M.** 1908. Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und Ernährung. München. **Spek J.** 1919. Experimentelle Beiträge zur Physiologie der Zellteilung. Biol. Zentrabl. **39** (23). **Vieweger T.** 1918. Zależność rozwoju wymoczków od rozwoju bakteryj. Spraw. Tow. Nauk. Warsz. **11** (847). **Viewegerowie J. i T.** 1921. L'influence de la quantité de la nourriture et du jeûn, Trav. Instit. Nencki. **1**. **Vieweger T.** 1928. Les rapports entre le développement des bacteries et des infusoires. Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. **21** (700). **Weismann A.** 1882. Über die Dauer des Lebens. Jena. **Weismann A.** 1892. Über Leben und Tod. Jena. **Woodruff L. L.** 1908. The life cycle of *Paramecium* when subjected to a varied environment. Amer. Natur. **42** (520). **Woodruff L. L.** 1911. Two thousand generations of *Paramecium*. Arch. Protistenk. **21** (263). **Woodruff L. L.** (1911). The effect of excretion products of *Paramecium* on its rate of reproduction. Journ. Exp. Zool. **10** (558). **Woodruff L. L.** 1913. Dreitausend und dreihundert Generationen von *Paramecium caudatum*. Biol. Zentralbl. **33** (34). **Woodruff L. L.** 1912. A summary of the results of certain physiological studies on a pedigreed race of *Paramecium* without conjugation. Biolog. Bull. **1** (396). **Woodruff L. L.** 1912. A five years pedigreed race of *Paramecium* without conjugation. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **9** (121). **Woodruff L. L.** 1913. The production of specific excretion products by Infusoria. Biolog. Bull. **1** (465), Journ. Exp. Zool. **14** (579). **Yocom H. B.** 1928. The effect of the quantity of culture medium on the division rate of *Oxytricha*. Biol. Bull. **54** (410).

STATISTIQUE MATHÉMATIQUE. — *Sur la limite de la vraisemblance de l'hypothèse.* Note (1) de M. J. NEYMAN.

Soit W un collectif enfermant les individus divisé en k catégories, et soit p_i la probabilité pour qu'un individu tiré au hasard de W appartienne à $i^{\text{ième}}$ catégorie ($i = 1, 2, \dots, k$). On effectue N tirages indépendants du collectif, et soit n_i le nombre des individus tirés appartenant à l' $i^{\text{ième}}$ catégorie ($i = 1, 2, \dots, k$). Posons encore $q_i = \frac{n_i}{N}$. Les nombres n_i sont donnés.

Les nombres p_i ne le sont pas et nous allons considérer les hypothèses concernant ces nombres p_i et que nous allons appeler les hypothèses statistiques. On distingue les hypothèses simples et les hypothèses composées. Une hypothèse h est dite simple si elle détermine la probabilité du fait observé Σ , à savoir de l'effet N tirages indépendants caractérisé par les nombres q_i . Pour qu'une hypothèse sur les nombres p_i soit simple, il est nécessaire qu'elle détermine les nombres p_i . Toute hypothèse H qui n'est pas simple est dite composée. H peut être transformée en une hypothèse simple. Pour cela, il lui faut seulement ajouter quelques suppositions supplémentaires. Ces suppositions étant arbitraires (dans certaines limites), on voit qu'à une hypothèse composée H , il correspond un ensemble W_H des hypothèses simples.

Désignons par E l'ensemble des hypothèses simples admissibles par P_h la probabilité du fait Σ déterminée par l'hypothèse simple h contenue dans E , et enfin par P la borne supérieure des nombres P_h . On appelle la vraisemblance d'une hypothèse simple h par rapport à l'ensemble E le nombre

$$\lambda_h = \frac{P_h}{P}.$$

Soit P_H la borne supérieure des nombres P_h correspondant aux hypothèses simples contenues dans W_H déterminé par une hypothèse composée H . On appelle la vraisemblance de l'hypothèse composée H le

(1) Séance du 6 mai 1929.

rapport (1)

$$\lambda = \frac{P_n}{P}$$

Considérons s fonctions linéaires

$$\theta_i = \sqrt{N} \sum_{j=1}^k \lambda_{ij} (p_j - q_j) \quad (i=1, 2, \dots, s),$$

les nombres λ étant constants, et une hypothèse composée H que les fonctions θ_i ont des valeurs données $\bar{\theta}_i$.

THEOREME I. — *Si le nombre des observations N augmente indéfiniment, les rapports q_i restant fixes, la vraisemblance de l'hypothèse H tend vers la limite $e^{-\frac{\chi_i^2}{2}}$ où χ_i^2 est le minimum de*

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i}$$

calculé en supposant que les fonctions θ_i possèdent les valeurs hypothétiques $\bar{\theta}_i$.

Pour la démonstration fixons un nombre χ_0 et soit $\Omega_{\chi_0^2}$ l'ensemble des points dans l'espace à $k-1$ dimensions aux coordonnées p_1, p_2, \dots, p_{k-1} pour lesquelles $\chi^2 \leq \chi_0^2$.

On démontre que si N est assez grand, pour tout point h dans $\Omega_{\chi_0^2}$ on a

$$\lambda_h = \prod_{i=1}^k \left(\frac{p_i}{q_i} \right)^{n_i} = e^{-\frac{\chi^2}{2} + \tau_1}$$

où $|\tau_1| < \varepsilon$, ε étant un nombre positif arbitraire. On démontre ensuite que sur toute droite L passant par le point Σ aux coordonnées $p_i = q_i$ ($i=1, 2, \dots, k-1$) la fonction λ_h possède un seul maximum au point Σ .

Effectuons une transformation introduisant les variables y_i au lieu des p_i ($i=1, 2, \dots, k-1$). Les formules de transformation sont :

$$p_i = q_i - A_{i-1} y_{i-1} \sum_{t=1}^{i-1} q_t + q_i \sum_{t=i}^{k-1} A_t y_t \quad (i=1, 2, \dots, k-1),$$

(1) J. NEYMAN et E. S. PEARSON, *On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference* (*Biometrika*, 20 A, 1928, p. 175-240 et 263-294).

où $\Lambda_i^2 = \frac{q_{i+1}}{i \frac{q_{i+1}}{i+1}}$. On voit aisément que $\chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} y_i^2$ et que les fonctions θ_i

$$N \sum_{i=1} q_i \sum_{r=1} q_r$$

seront transformées en des fonctions linéaires en y_i avec les coefficients indépendants de N.

Choisissons χ_0^2 assez grand pour que le domaine $\Omega_{\chi_0^2 - 3\varepsilon}$ contienne des points satisfaisant les conditions $\theta_i = \bar{\theta}_i$ ($i = 1, 2, \dots, s$). Désignons par A un tel point et par B un point pour lequel

$$\theta_i = \bar{\theta}_i \quad (i = 1, 2, \dots, s) \quad \text{et} \quad \chi^2 = \sum_{i=1}^{k-1} y_i^2 > \chi_0^2.$$

On démontre que $\lambda_A > \lambda_B$, quels que soient les points A et B. On prouve alors aisément que la vraisemblance de l'hypothèse H peut être écrite sous la forme

$$\lambda_H = e^{-\frac{1}{2} \chi^2 + \eta},$$

où $|\eta| < \varepsilon$, pourvu que N soit assez grand.

Il est aisé aussi de démontrer un théorème plus général.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 188, p. 1360, séance du 27 mai 1929.)

STATISTIQUE MATHÉMATIQUE. — *Sur une méthode de vérification des hypothèses.* Note ⁽¹⁾ de M. J. NEYMAN.

En jugeant si une hypothèse statistique peut être admise ou non on peut commettre les erreurs des deux sortes : 1° on peut rejeter une hypothèse vraie et 2° on peut en accepter une fausse. Pour éviter autant que possible les erreurs de deuxième sorte on calcule la vraisemblance λ_0 de l'hypothèse donnée H. Si λ_0 est petite, on est incliné de rejeter l'hypothèse. Pour contrôler les erreurs de première sorte on apprécie la probabilité P_{II} pour qu'en rejetant une hypothèse dont la vraisemblance $\lambda \leq \lambda_0$, on rejette une hypothèse vraie. Si les deux nombres λ_0 et P_{II} ont été jugés petits, on rejette l'hypothèse H ⁽²⁾.

Considérons un collectif W divisé en k catégories avec les probabilités p_i (inconnues) pour qu'un individu tiré au hasard de W appartienne à l' $i^{\text{ième}}$ catégorie ($i = 1, 2, \dots, k$). Soit ensuite Σ l'effet de N tirages indépendants de W, caractérisé par les nombres n_i des individus tirés et appartenant à l' $i^{\text{ième}}$ catégorie. Posons $q_i = \frac{n_i}{N}$. Si l'hypothèse composée H $s^2 s$ s'exprime en s équations indépendantes

$$(1) \quad \theta_j = \sqrt{N} \sum_{i=1}^k a_{ij}(p_i - q_i) = \bar{\theta}_j \quad (j = 1, 2, \dots, s),$$

où a_{ij} et $\bar{\theta}_j$ sont des constantes. Il suit du Mémoire déjà cité, que pour N très grand (1) la vraisemblance de H ne diffère que très peu de $e^{-\frac{\chi_0^2}{2}}$, où χ_0^2 est le minimum de

$$N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{p_i},$$

⁽¹⁾ Séance du 6 mai 1929.

⁽²⁾ J. NEYMAN et E.-S. PEARSON, *On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference* (*Biometrika*, 20 A, 1928, p. 175-240 et 263-294)

calculé à conditions (1), et (2) que la probabilité P_H (si l'on convient d'admettre qu'elle a un sens) ne surpasse pas le nombre

$$J = \frac{\int_{\chi_0}^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}.$$

Cette dernière conclusion est tout à fait indépendante de la théorie des probabilités *a posteriori*.

Il est intéressant qu'en s'appuyant sur la théorie des probabilités *a posteriori*, on obtienne pour apprécier P_H une expression I, qui est la limite de J lorsque $N \rightarrow \infty$.

Soient R la probabilité pour que l'hypothèse H soit vraie et T la probabilité *a posteriori* pour que l'hypothèse vraie ait une vraisemblance $\lambda \leq \lambda_0$. Évidemment

$$P_H = RT \leq T.$$

Donc P_H peut être appréciée par la probabilité T.

Supposons que la loi de probabilité *a priori* $\psi(p_1, p_2, \dots, p_{k-1})$ est : 1° positive au point $p_i = q_i$ ($i = 1, 2, \dots, k-1$), et 2° qu'elle y est continue. On sait alors que si N est très grand, la probabilité *a posteriori* pour que le point C aux coordonnées p_i ($i = 1, 2, \dots, k-1$) appartienne à un domaine Q quelconque, ne diffère que très peu de

$$\frac{\int \int \dots \int_Q e^{-\frac{\chi^2}{2}} dp_1, dp_2, \dots, dp_{k-1}}{\int \int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{\chi^2}{2}} dp_1, dp_2, \dots, dp_{k-1}},$$

où ω désigne tout l'espace des p_i ($-\infty < p_i < \infty$) et où

$$\chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i}.$$

THÉORÈME. — Si la loi de probabilité *a priori* satisfait les deux conditions imposées plus haut, la probabilité *a posteriori* T tend vers

$$\frac{\int_{\chi_0}^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi},$$

lorsque $N \rightarrow \infty$, où χ_i^2 est le minimum de χ^2 calculé à condition que $\theta_i = \bar{\theta}_i$ ($i = 1, 2, \dots, s$).

Soit λ_{11} la vraisemblance d'une hypothèse composée H. Ce sera une fonction des nombres $\bar{\theta}_i$. Soit λ_0 la valeur de cette fonction calculée pour un cas donné. En s'appuyant sur le fait (1) que pour N très grand λ_0 ne diffère que très peu de $e^{-\frac{1}{2}\chi_0^2}$ on démontre que T tend vers

$$I = \frac{\int \int \dots \int_{Q_1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1, \dots, dp_{k-1}}{\int \int \dots \int_{\omega} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} dp_1, \dots, dp_{k-1}},$$

où Q_1 est le domaine dans ω où χ_i^2 , considéré comme une fonction des $\bar{\theta}_i$ ($i = 1, 2, \dots, s$), possède une valeur plus grande que celle déterminée par l'hypothèse H dans le cas considéré.

Moyennant les transformations des coordonnées convenables on trouve que

$$I = \frac{\int_{\chi_1}^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi}{\int_0^{\infty} \chi^{s-1} e^{-\frac{1}{2}\chi^2} d\chi},$$

et le théorème est établi.

(1) J. NEYMAN, *Note sur la limite de la vraisemblance de l'hypothèse* (*Comptes rendus*, 188, 1929, p. 1360).

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. 188, p. 1467, séance du 3 juin 1929.)

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego].

Br. Zawadzki.

**Badania nad rozmieszczeniem niektórych krystalloidów
w układach koloidalnych, zbliżonych do cytoplazmy.**

*Researches on the distribution of certain crystalloids in colloidal
systems similar to cytoplasm.*

Rękopis nadesłany w dniu 22.X.1929 r.

This paper deals with the distribution of sucrose, maltose, glucose, laevulose, urea, and sodium, potassium, calcium and magnesium chlorides in egg yolk (*Gallus domesticus* L.) solutions containing 50% by volume of added isotonic salt solution, as well as of sucrose, glucose, galactose, and urea in 33.3% aqueous solutions of dried ovalbumin. It follows from the work of a number of authors that hydrophile colloidal systems, such as are the above solutions, contains apart from the colloid itself, two types of water, differing in their behaviour towards crystalloids; these types we have termed „combined“ and „free“ water. The above research consisted firstly in the determination of the concentration of added solutes in the free water, using cryoscopic methods, or, in the case of electrolytes, ultrafiltration was applied to the determination of chlorine. A comparison of the concentration, expressed in mg./cc., u of solute in free water with the concentration c_t which should theoretically be given by the given solute were it to be distributed uniformly throughout the entire volume v of the water of the system, shows whether the solute is distributed uniformly throughout the solvent, unevenly in the two types of the latter, and, finally, whether adsorption or combination with the colloid has taken place. The solubility of all carbohydrates in free water was both for eggs yolk and white solutions greater than the theoretical solubility. On the assumption that this difference is due to solution of car-

bohydrate solely in free water d , the volume per cc. of the latter in the given systems was calculated from the equation $d = c : u$ where c represents the amount of solute added per cc. of the system. The ratio $c : u$ should, if it is to remain equal to d , be a constant for all sugars, and this was found to be the case, within the limits of experimental error (tab. III—VI for egg-yolk, VII for ovalbumin). We have thus at the same time showed that sugars dissolve exclusively in free water, and that the ratio $c : u$ gives a constant value d for all sugars. In the case of urea it has been found that its actual concentration is on the whole less than the theoretical value c_t (tab. VIII and IX), pointing to its concentration in some part of the system. Since, however, the above difference appeared on the whole to be independent of concentration of urea, it is supposed that we have here to do not with adsorption on the colloid, but with concentration in the combined water. Sodium and potassium chlorides gave actual concentrations u identical within the limits of experimental error with the theoretical values c_t (tab. X and XI), whence it is concluded that these salts are uniformly distributed throughout the system.

Calcium and magnesium chlorides are in all probability adsorbed by the colloid, as is indicated by the diminution of percentage sorption with increasing concentration of solute (tab. XII and XIII). For all four salts cryoscopic data were on the whole in entire agreement with determinations of the chlorine content of the ultrafiltrates of the diluted egg yolk, pointing to the similar behaviour of both anions and cations.

In order to ascertain to what extent the value for the volume of free water, d , corresponds to that of the intermicellar fluid, the value of the latter volume was computed from viscosity data, basing our calculations on KUNITZ's formula (26). As is shown by table XIV, the values obtained by both methods are on the whole in agreement with each other.

1. Wstęp.

Sprawa rozmieszczenia krystaloidów w układach koloidalnych hydrofilnych ma ogromne znaczenie dla całego szeregu zjawisk życiowych, a przede wszystkim dla zagadnień wymiany materji, dla reakcyj enzymatycznych oraz dla wszelkich spraw, w których biorą udział elektrolity nieorganiczne. Ze względu na znaczenie tego zagadnienia, cały szereg autorów zajmował się nim, że wymienimy tu między innymi prace AUGSBERGERA ('25), BIAŁASZEWICZA ('27, '28 b, '28 c, '29), BERCZELLERA ('18), BUGAR-SZKY'EGO i LIEBERMANN ('98), COHNA ('25), EGE'GO ('22), FREDERICQA ('02, '04), HAMBURGERA ('02), LOEBA ('22), NETTERA ('27), NORTHROPA i KUNITZA ('25, '26), PAULI'EGO ('20, '26), POLÁNYI'EGO ('20), RONY ('10).

Jak wynika z prac tych autorów, wpływ koloidów na rozmieszczenie krystaloidów zaznacza się głównie w 3-ch kierunkach. Przede wszystkim koloidy zajmują znaczną część objętości roztworów. Wskutek tego, krystaloidy znajdują się w roztworze w objętości mniejszej, niż objętość układu. Następnie koloidy hydrofilne wiążą część wody, która tworzy t. zw. otoczki wodne na cząstkach koloidu, przyczem związana część wody zachowuje się odmiennie w stosunku do niektórych krystaloidów, niż część niezwiązana. Wreszcie wiele krystaloidów ulega wiązaniu przez koloidy w sposób odwracalny, przyczem stopień wiązania zależy od ogólnej koncentracji krystaloidu. Wynika stąd, że w układzie koloidalnym hydrofilnym mamy do czynienia z trzema składnikami, a mianowicie z koloidem, z wodą związaną przez koloid oraz z niezwiązaną częścią wody, którą będziemy nazywali wodą wolną. Jak wynika dalej z prac wymienionych autorów, poszczególne krystaloidy wykazują różne stężenie w każdym z tych składników, brak jednak było systematycznych badań porównawczych nad rozmieszczeniem poszczególnych typów krystaloidów w każdym z tych trzech składników układu.

W pracy niniejszej staraliśmy się określić rodzaj rozmieszczenia czterech typów krystaloidów, mianowicie — cukrów, mocznika, chlorków alkaliów oraz chlorków ziem alkalicznych w dwukrotnie rozcieńczonem żółtku jaj kurzych, które uważaliśmy za układ zbliżony do cytoplazmy. W tym celu należało

przedewszystkiem oznaczyć objętość względną każdego ze składników w stosunku do objętości całego układu, a następnie stężenie, względnie całkowitą zawartość dodanego krystaloidu w każdej części układu.

2. Materiał.

A. Wybór materiału. Zasadnicze badania nad rozmieszczeniem krystaloidów przeprowadzaliśmy w rozcieńczonym żółtku jaj kurzych (*Gallus domesticus* L.). Materiał ten okazał się bardzo odpowiednim ze względu na to, że ten rodzaj cytoplazmy można otrzymać w dowolnych ilościach w stanie zupełnie czystym, zaś wobec braku struktur stałych stanowi on masę całkowicie jednorodną, dzięki czemu oznaczenia równoległe dają naogół wyniki zgodne. Przytem jest to materiał niewątpliwie fizjologicznie ważny i nasuwający dla naszego zagadnienia wiele punktów zaczepienia, jak to wynika z prac BIAŁASZEWICZA ('26, '27, '28, '29), dotyczących tegoż zagadnienia i wykonanych częściowo właśnie na tym materiale. Rozcieńczenie żółtka było konieczne, jakkolwiek bowiem badanie żółtka nierozcieńczonego byłoby ciekawe i dla zagadnień fizjologicznych ważniejsze, to jednak, ze względu na wielką lepkość tego materiału, badania te, zwłaszcza opierające się na ultrafiltracji, są metodycznie niewykonalne. W każdym razie staraliśmy się jak najmniej zmienić warunki układu, jak to wynika z podanego dalej opisu rozcieńczania.

Prócz tego zasadniczego materiału część doświadczeń wykonano w roztworach białka (*Albumen ex ovis siccum* z f. Spiess) w wodzie destylowanej. Badania te miały na celu skontrolowanie pewnych wyników, otrzymanych w żółtku rozcieńczonym.

B. Oczyszczanie materiału. Żółtka jaj kurzych, starannie oddzielone od białka, przemywano kilkakrotnie izotonicznym roztworem soli kuchennej, a następnie osuszano bibułą.

C. Rozcieńczanie żółtka. Do każdej serji oznaczeń używano około 10 jaj, zaś do doświadczeń, w których stosowano ultrafiltrację, nawet przeszło 30 jaj. W ten sposób ewentualne różnice indywidualne zacierają się całkowicie, jak to widać z porównania wyników otrzymanych w różnych doświadczeniach dla tych samych substancyj, użytych w tych samych stężeniach (tab. I). Pierwsze trzy kolumny tabeli pierwszej obejmują dane dla jednakowych stężeń sacharozy, odpowiadających kolumnie czwartej tabeli III i IV, następne trzy kolumny odpowiadają stężeniom pozycji piątej tabeli III i IV. Widzimy, że wartości ilorazu $c : u$, otrzymane dla tych samych stężeń w różnych doświadczeniach, nie różnią się więcej, niż dla różnych stężeń w tem samym doświadczeniu (tab. III i IV) pomimo, że doświadczenia 7, 8 i 9 były przeprowadzone na wiosnę, zaś 18 na jesień.

W celu zachowania warunków możliwie zbliżonych do istniejących w żółtku nierozcieńczonym, do rozcieńczania użyto płynu o składzie zbliżonym do składu cieczy międzycząstkowej. Przy sporządzaniu płynu oparto się na wynikach pracy BIAŁASZEWICZA ('27). Skład płynu, co do

ogólnego stężenia soli, był niezawsze jednakowy, gdyż starano się o utrzymanie izotoniczności z żółtkiem zaś obniżenie punktu zamarzania żółtka ulega dość dużym wahaniom w zależności od wieku jaj (BIAŁASZEWICZ '12). Natomiast stosunek stężeń poszczególnych jonów utrzymywano stały w ten sposób, że sporządzono roztwór hipertoniczny, który w miarę potrzeby rozcieńczano. Skład tego roztworu był następujący: 6.54 g KCl + + 1.44 g NaCl + 1.18 g CaCl₂ + 1.05 g MgCl₂ + 1000 cm³ wody. Odpowiednio

Tabela I.

Porównanie wyników badania rozmieszczenia sacharozy w żółtku dwukrotnie rozcieńczonym, otrzymanych w różnych doświadczeniach.

Comparison of the results obtained from different experiments, of the investigation of the distribution of sucrose in 50% egg-yolk.

№ pozycji Item №	№ doświadczenia, № oznaczenia i data № of experiment, № of determination and date	7/IV 8-9.III 1928	8/IV 13-14.III 1928	9/VII 15-20.III 1928	7/V 8-9.III 1928	8/V 13-14.III 1928	18/VI 18-21.IX 1928	
1	½ płynu rozcieńczającego <i>of diluting liquid</i> żółtka <i>of yolk</i>	bez sacharozy Δ_1 <i>without sucrose</i>	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	
2		z sacharozą Δ_2 <i>with sucrose</i>	0.940 ⁰	0.940 ⁰	0.940 ⁰	1.006 ⁰	1.006 ⁰	1.006 ⁰
3		bez sacharozy Δ_3 <i>without sucrose</i>	0.502 ⁰	0.507 ⁰	0.495 ⁰	0.502 ⁰	0.507 ⁰	0.430 ⁰
4		z sacharozą Δ_4 <i>with sucrose</i>	1.086 ⁰	1.104 ⁰	1.107 ⁰	1.192 ⁰	1.196 ⁰	1.117 ⁰
5	Stężenie sacharozy w mg/cm ³ <i>Concentration of sucrose in mg/ccm.</i>	w całym żółtku <i>c</i> <i>in whole system</i>	74.0	74.0	74.0	85.5	85.5	85.5
6		w cieczy międzycząstkowej <i>u</i> <i>in the intercellular fluid</i>	102.4	104.7	106.9	121.0	121.0	120.4
7		teoretyczne <i>c_t</i> <i>theoretical</i>	98.4	98.4	98.4	113.5	113.5	113.5
8		Przyrost stężenia <i>u</i> w stosunku do <i>c_t</i> <i>absolute</i>	+4.0	+6.3	+8.5	+7.5	+7.5	+6.9
9	<i>Difference between actual concentration u and c_t</i>	procentowy $\frac{u-c_t}{c_t}$ <i>as per cent 100</i>	+4.2%	+6.5%	+8.6%	+6.5%	+6.5%	+6.1%
10	Wartość ilorazu <i>c : u</i> <i>Value of quotient</i>	0.723	0.707	0.692	0.707	0.707	0.710	

rozcieńczonym roztworem, który będziemy stale nazywali płynem rozcieńczającym, rozcieńczano żółtko we wszystkich doświadczeniach ściśle dwukrotnie objętościowo. W tym celu żółtka oczyszczone ważono, mnożąc ciężar przez objętość właściwą otrzymywano objętość żółtka, poczem odmierzano taką samą objętość płynu rozcieńczającego.

Objętość właściwą żółtka oznaczano przy pomocy piknomtru o szerokiej szyjce, stosowanego przy badaniu ciężaru właściwego melasy, gdyż wobec wielkiej lepkości żółtka zwykły piknometr o wąskiej szyjce okazał

się nieodpowiednim. Średnia wartość objętości właściwej żółtka wyniosła 0.970 (0.967 — 0.969 — 0.972).

D. Rozpuszczanie białka. Białko kupne ucierano na proszek i rozpuszczano w wodzie destylowanej w stosunku 100 g białka na 200 cm³ wody. Białko zawierało duże ilości krystaloidów, zwłaszcza soli, jak na to wskazuje Δ tak przyrządzonego roztworu, które wynosiło 1.393° — 1.411°, oraz duża zawartość chloru w ultraprzesączkach roztworów bardziej rozcieńczonych. Dokładniej składników mineralnych nie badano, gdyż chodziło tylko o badania porównawcze w jednakowo przyrządzonych roztworach. Ażeby określić, jaką część objętości zajmuje w roztworze woda dodana, oznaczono objętość właściwą sproszkowanego białka. Oznaczenie wykonano w tym samym piknometrze o szerokiej szyjce, wypełniając przestrzeń wolną po nasypaniu zważonej ilości białka alkoholem amylovym, który zachowywał się zupełnie obojętnie w stosunku do białka. Znając objętość właściwą alkoholu amylowego, można było z różnicy ciężarów przed i po dodaniu alkoholu obliczyć objętość właściwą białka, która wyniosła 0.765 (0.762 — 0.765 — 0.768). Ponieważ objętość wody wolnej w roztworze białkowym zależy w znacznym stopniu od stężenia jonów wodorowych roztworu, uznaliśmy za wskazane określić pH obu rodzajów roztworów. Wyniosło ono dla żółtka rozcieńczonego 6.14, zaś dla roztworu białka 6.22.

3. Metoda.

Z uwag podanych we wstępie wynika, że dla określenia rozmieszczenia krystaloidu w układzie koloidalnym musimy oznaczyć następujące wielkości:

1°. Całkowite stężenie badanego krystaloidu w układzie koloidalnym, czyli ilość substancji w mg, dodanej do 1 cm³ układu. Oznaczamy ją przez c .

2°. Stężenie krystaloidu w wodzie wolnej układu. Wyrazimy je również w mg na 1 cm³ i oznaczmy przez u .

3°. Całkowitą objętość wody w cm³, zawartą w 1 cm³ układu. Oznaczmy ją przez v . Wówczas objętość koloidu będzie równa $1 - v$ cm³.

4°. Objętość wody wolnej w cm³, zawartej w 1 cm³ układu. Oznaczmy ją przez d . Wówczas objętość wody związanej będzie równa $v - d$.

5°. Dla całkowitego scharakteryzowania rozmieszczenia musimy jeszcze oznaczyć albo stężenie ciała w wodzie związanej, albo ilość krystaloidu związaną przez koloid zawarty w 1 cm³ układu, albo wreszcie ilość ciała zawartą w całej wodzie w 1 cm³ układu. Znając którąkolwiek z tych wielkości,

moglibyśmy na podstawie poprzednio wymienionych danych obliczyć obie pozostałe, i tem samym moglibyśmy oznaczyć zawartość krystaloidu w każdym z trzech składników układu. Niestety nie mamy metody, któraby nam pozwoliła oznaczyć którąkolwiek z wspomnianych wielkości. Wynika stąd, że całkowite określenie rozmieszczenia krystaloidu jest możliwe tylko wówczas, gdy ciało badane znajduje się wyłącznie w wodzie wolnej. Nie jesteśmy natomiast w stanie rozstrzygnąć, czy część krystaloidu, która nie znajduje się w wodzie wolnej, a której wartość liczbowa wyniosłaby w 1 cm^3 $c - du$, znajduje się w wodzie związanej, czy też jest związana bezpośrednio przez koloid, względnie — czy zachodzą obie możliwości jednocześnie. W tym ostatnim przypadku nie możemy również określić, w jaki sposób krystaloid jest rozdzielony pomiędzy te dwa składniki. Jakkolwiek nie jesteśmy więc w stanie z całą stanowczością rozstrzygnąć tych wątpliwości, to jednak, jak się przekonamy przy omawianiu wyników, istnieją pewne wskazówki, które pozwalają nam z pewną dozą prawdopodobieństwa wnioskować o tem, czy część krystaloidu, niezawarta w wodzie wolnej, znajduje się w wodzie związanej, czy też jest związana przez koloid.

Oprócz czterech wspomnianych wielkości, a mianowicie c , v , u i d , wprowadzimy jeszcze jedną, którą nazwiemy stężeniem teoretycznym i oznaczymy przez c_t . Wielkość tę otrzymujemy dzieląc całą ilość krystaloidu dodanego do 1 cm^3 układu czyli c przez objętość całej wody v , a więc $c_t = c : v$. Łatwo spostrzec, że takie właśnie stężenie wystąpiłoby, gdyby ciało dodane nie podlegało żadnym wpływom koloidu, ani przyciągającym, ani odpychającym. Wówczas wartość liczbowa u pokrywałaby się z wartością c_t .

W przypadku natomiast, gdyby cały krystaloid znajdował się tylko w wodzie wolnej, u byłoby większe od c_t , zaś odwrotnie, w przypadku wiązania krystaloidu przez koloid, otrzymalibyśmy u mniejsze od c_t . Widzimy więc, że z wartości różnicy $u - c_t$ możemy odrazu wnioskować o rodzaju rozmieszczenia krystaloidu w układzie.

Podamy metody oznaczania wspomnianych wielkości.

1. Całkowite stężenie krystaloidu (c).

Oznaczenie wielkości c nie nastroczało żadnych trudności, gdyż każdorazowo do układu badanego dodawano substancję w ten sposób, że do

kolbki, zawierającej odważoną ilość tej substancji, dolewano odpowiednią objętość roztworu koloidalnego. Wobec tego stężenie należy rozumieć w tem znaczeniu, że podana liczba miligramów przypada na 1 cm³ rozpuszczalnika, a nie roztworu.

2. Stężenie krystaloidu w wodzie wolnej układu (*u*). Stężenie to określano metodą dializy kompensacyjnej (RONA '10, POLAŃNY '20 i wielu innych). Polega ona na dobraniu roztworu danego krystaloidu o takim stężeniu, ażeby po zanurzeniu roztworu koloidalnego zawartego w dializatorze, do takiego roztworu, nie zaszła zmiana stężenia krystaloidu. Wówczas stężenie krystaloidu w wodzie wolnej jest równe jego stężeniu w płynie zewnętrznym.

W naszej pracy posługiwaliśmy się metodą krjoskopową. Metodę tę stosowali FREDERICQ ('01) oraz EGE ('22). Polega ona na tem, że oznacza się Δ (obniżenie punktu zamarzania) układów badanych przed dodaniem substancji i po jej dodaniu, poczem z różnicy Δ wnioskuje się o stężeniu substancji w cieczy międzycząstkowej układu. Metoda ta opiera się na założeniu, że znana proporcjonalność Δ roztworu do stężenia substancji jest własnością ściśle addytywną, to znaczy, że każda substancja obecna w układzie spowoduje obniżenie odpowiadające jej stężeniu niezależnie od obniżenia, spowodowanego przez inne osmotycznie czynne ciała, obecne w roztworze. Jeżeli więc, po dodaniu do roztworu, posiadającego np. $\Delta = \Delta_1$, pewnej substancji, oznaczymy ponownie Δ i otrzymamy wartość Δ_2 , to przypuszczamy, że $\Delta_2 - \Delta_1$ będzie równe temu Δ , jakie posiadałby roztwór tej samej substancji o tem samym stężeniu w wodzie czystej. Tymczasem EGE ('22) przy omawianiu tej metody zwraca uwagę na to, że rozpuszczając nową substancję w roztworach, zawierających już inne substancje, a w szczególności elektrolity, jak to ma miejsce w badanych przez nas układach, możemy zmieniać własne Δ układu, a więc Δ_1 przez zmianę dysocjacji elektrolitów, znajdujących się w roztworze.

Ażeby skompensować wpływ tego czynnika, przynajmniej w stosunku do rozcieńczonego żółtka, oznaczaliśmy zależność pomiędzy stężeniem substancji i odpowiadającym mu Δ nie w czystej wodzie, lecz w płynie rozcieńczającym. Wobec tego, że płyn rozcieńczający miał skład mineralny zbliżony do składu cieczy międzycząstkowej, własne Δ tych płynów powinno się zmienić przez dodanie nowej substancji w jednakowym stopniu, a ponieważ obliczaliśmy stężenie substancji w cieczy międzycząstkowej z Δ , przypadającego na daną substancję, opierając się na stosunku tych wielkości w płynie rozcieńczającym, więc te jednakowe zmiany się zniosą i na wartość *u*, oznaczonego tą metodą, nie powinny wpłynąć. Obliczenie stężenia substancji z przypadającego na nią Δ opiera się na proporcjonalności tych wielkości. Zależność ta nie jest jednak ściśle linjowa, to też w praktyce oznaczaliśmy Δ odpowiadające kilku stężeniom substancji w płynie rozcieńczającym, możliwie bliskim do spodziewanego *u*, i następnie dla danego Δ obliczaliśmy odpowiadające mu stężenie przez interpolację. W naszych doświadczeniach oznaczaliśmy Δ dla takich stężeń substancji w płynie rozcieńczającym, jakie stosowaliśmy później w ukła-

dzie. Stężenia takie oznaczaliśmy przez c . Tak więc znaliśmy zmiany Δ , jakie powinny wywołać substancja po rozpuszczeniu w układzie, gdyby się w nim rozpuściła równomiernie. Stosowaliśmy zwykle kilka różnych stężeń z powodów podanych dalej, tak że mieliśmy dla każdej substancji kilka wartości c i odpowiadających im Δ , zarówno w płynie rozcieńczającym, jak i w układach badanych. W celu obliczenia u na podstawie znajomości Δ układu, zawierającego substancję dodaną w stężeniu c , posługiwaliśmy się następującym wzorem:

$$u = \frac{1}{2} \left(\frac{c' (\Delta_1 - \Delta_3)}{\Delta'_2 - \Delta_1} + \frac{c'' (\Delta_1 - \Delta_3)}{\Delta''_2 - \Delta_1} \right)$$

Poszczególne symbole mają tu następujące znaczenie: Δ_1 jest to Δ płynu rozcieńczającego, Δ'_2 i Δ''_2 są to Δ płynu rozcieńczającego po dodaniu doń substancji badanych w stężeniach c' i c'' , przy czym c' jest równe c , czyli stężeniu substancji w całej objętości układu, c'' jest najbliższe większe zbadane stężenie. Ponieważ c jest naogół mniejsze od u , więc c' i c'' są to dwa stężenia najbliższe do spodziewanego u . Z powyższego wynika, że $\Delta'_2 - \Delta_1$ i $\Delta''_2 - \Delta_1$ oznaczają Δ , przypadające w płynie rozcieńczającym na substancję dodaną w stężeniach c' i c'' . Δ_3 jest to Δ samego układu badanego. Δ_1 wreszcie, to Δ układu badanego po dodaniu doń substancji badanej w stężeniu c . A więc $\Delta_1 - \Delta_3$ to Δ przypadające na substancję dodaną w układzie badanym. Dla największych wartości nie można było stosować wzoru interpolacyjnego, gdyż nie mieliśmy już wartości c' i odpowiadającego mu Δ . Wówczas stosowaliśmy wzór

$$u = \frac{c (\Delta_1 - \Delta_3)}{\Delta_2 - \Delta_1}$$

Poszczególne symbole mają znaczenie podane powyżej.

Oznaczenia Δ wykonywaliśmy przy pomocy krjoskopu DEKHUYZENA ('08).

Badając rozmieszczenie elektrolitów stosowaliśmy do oznaczenia u obok metody krjoskopowej również metodę ultrafiltracyjną. Metodą tą posługiwaliśmy się między innymi BIALASZEWICZ w swoich badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w cytoplazmie ('27, '28, '29). Przy ultrafiltracji oddzielamy część cieczy międzycząstkowej od koloidu, stosując jako filtry błony nieprzepuszczające koloidów. Należy tu zaznaczyć, że elektrolity w układach koloidalnych mogą podlegać specjalnemu rodzajowi wiązania. Mianowicie jeden z jonów może być wiązany przez koloid więcej niż drugi, a mimo to jon niezwiązany nie może przejść do przesączu w ilości równoważnej ze związaną częścią jonu drugiego. Metoda krjoskopowa daje tylko globalne zmiany w stężeniu jonów, nie pozwalające wnioskować o zachowaniu się poszczególnych jonów. Jeżeli jednak zestawimy wyniki, otrzymane tą metodą, z wynikami, otrzymanymi metodą ultrafiltracji, możemy wyciągnąć pewne wnioski w tej sprawie. Mianowicie, jak wspominaliśmy, jon nie związany bezpośrednio nie będzie jednak mógł przejść do przesączu, gdyż jest on zatrzymywany przez naładowany elektrycznie koloid. Jeżeli więc obliczymy z pomiarów stężenia tego jonu w przesączu,

że zostało związane $x\%$ tego jonu, zaś w rzeczywistości ten jon nie był wcale związany bezpośrednio, a tylko $x\%$ drugiego jonu, to Δ , przypadające na ten elektrolit, zmniejszy się nie o $x\%$, jak to miałyby miejsce przy związaniu obu jonów, lecz o $\frac{1}{2}x$, jeżeli oba jony są tej samej wartościowości, jak w NaCl czy KCl, zaś o $\frac{1}{3}x$, jeżeliby w CaCl_2 lub MgCl_2 związanymi przez sam koloid jonami były Ca czy Mg. Jeżeli więc procent związanego chloru, w przypadku badanych przez nas soli, oznaczony na podstawie pomiarów Cl w przesączu, jest równy procentowi zmniejszenia Δ , to możemy wnioskować, że oba jony są związane w tym samym stopniu przez koloid, jeżeli zaś te wielkości nie są równe, to należy przypuszczać, że poszczególne jony są związane w różnym stopniu. Ażeby w tym ostatnim przypadku przekonać się, który jon jest wiązany, metoda ta nie wystarcza, ponieważ jednak, jak zobaczymy przy omawianiu wyników, dane otrzymane obydwojma metodami okazały się zgodne, więc mogliśmy się zatrzymać na tym sposobie, jako praktycznie nadzwyczaj prostym i dogodnym.

Co się tyczy wykonania ultrafiltracji, to postępowaliśmy tu naogół w sposób opisany w pracy BIALASZEWICZA ('27), z tą różnicą, że używaliśmy sączków nie kupnych, lecz własnej roboty, przygotowanych według następującego przepisu, opartego częściowo na pracach EGGERTHA ('21), LOONEY'A ('22) oraz ASHESHOVA ('25).

3g celoidyny Sheringa, drobno pokrajanej i wysuszonej rozpuszczano w mieszaninie 45g eteru etylowego zwykłego (nie bezwodnego) oraz 15g alkoholu etylowego 96%. Obecność wody zmniejsza lepkość roztworu, dzięki czemu można otrzymywać błony bardzo cienkie, a mimo to trwałe. Otrzymany roztwór celoidyny wylewano na płytkę szklaną, poczem przy pomocy pałeczki szklanej, opartej na podstawkach cokolwiek wyższych od płytki, rozprowadzano roztwór równomiernie po powierzchni płytki. Następnie płytkę wraz z warstwą celoidyny wkładano do naczynia z wodą. Jako moment odpowiedni, w którym należy płytkę umieścić w wodzie, po długich próbach ustaliliśmy chwilę, gdy zapach eteru znika, zaś występuje wyraźny zapach alkoholu. W tej chwili zanurzone błony dają optymalne warunki co do trwałości z jednej strony, oraz szybkości sączenia z drugiej. Wytworzona błona po pewnym czasie pozostawiania w wodzie daje się z łatwością oddzielić od płytki.

Do zwiększenia szybkości sączenia przyczyniło się w bardzo dużym stopniu, oprócz zastosowania cienkich i w odpowiednim momencie zanurzonych do wody sączków, intensywne mieszanie roztworu i ścieranie powierzchni sączka przy pomocy mieszadła zakończonego szerokim płaskim pędzlem.

W przesączach badaliśmy tylko stężenie chloru, stosując mikrometodę WHITEHORNA ('20).

Że wyniki otrzymane metodą ultrafiltracyjną, po uwzględnieniu ostrożności, opisanych przez BIALASZEWICZA ('27, str. 6) zasługują na zaufanie, świadczą dane tabeli II, gdzie mamy porównanie Δ żółtka rozcieńczonego przed sączeniem, po odsączeniu pewnej porcji (około 15% objętości) i wreszcie ultrapresączu. Jak widzimy, ultrafiltracja nie wpływa

zupełnie na ogólne stężenie krystaloidów w wodzie wolnej oraz ultraprzesącza, oczywiście, o ile nie wchodzi w grę równowaga DONNANA. Δ tych płynów nie różni się więcej, niż poszczególne oznaczenia tych samych płynów.

Elektromotorycznego oznaczania stężenia poszczególnych jonów, stosowanego przez wielu autorów w stosunku do jonów H oraz Cl (BÜGARSZKY i LIEBERMANN '98, PAULI '20, LOEB '22 i inni), nie mogliśmy stosować ze względu na brak elektrod, któreby pozwalały oznaczać obok siebie K, Na, Ca oraz Mg.

Tabela II.

Porównanie Δ żółtka dwukrotnie rozcieńczonego przed sączeniem (w doświadczeniach 16 i 17 bez dodatku substancji, w doświadczeniu 20 po dodaniu CaCl_2 w ilości 6.15 mg na 1 cm^3 żółtka), Δ pozostałości po odsączeniu około 15% objętości oraz Δ przesącza.

Comparison of Δ of 50% yolk, before ultrafiltration (in experiment 16 and 17 without addition of solute, in experiment 20 with 6.15 mg CaCl_2 per cc. of yolk) with that of the residue after separation of about 15% by volume of ultrafiltrate and with that of the ultrafiltrate.

№ pozycji Item №	№ doświadczenia of experiment		16	17	20	
1	Δ żółtka rozcieńczonego of diluted yolk	przed sączeniem before ultrafiltration	oznaczenie determination I	0.480 ⁰	0.478 ⁰	0.716 ⁰
			oznaczenie determination II	0.483 ⁰	—	—
		po odsączeniu około 15% objętości after ultrafiltrat. of about 15% by volume		0.484 ⁰	0.483 ⁰	—
4	Δ przesącza of ultrafiltrate			0.481 ⁰	0.483 ⁰	0.712 ⁰

3. Objętość całej wody zawartej w układzie (v).

Oznaczyliśmy ją w następujący sposób: przedewszystkiem oznaczyliśmy procentową zawartość wody w nierozcieńczonym żółtku, względnie w sproszkowanym białku, z różnicy ciężarów po usunięciu wody w suszarce próżniowej w temperaturze około 55° C. Odpowiednie wartości wynoszą dla nierozcieńczonego żółtka 49.0% (48.82 — 48.90 — 49.32), dla sproszkowanego białka 14.4% (14.3 — 14.4). Znając objętość właściwą tych ciał (str. 124) oraz stopień rozcieńczenia obliczyliśmy, jaką objętość zajmuje woda w jednym cm^3 rozcieńczonego żółtka, względnie roztworu białka.

Obliczenie przeprowadziliśmy, opierając się na następujących rozważaniach: jeżeli 1 g żółtka nierozcieńczonego zajmuje objętość 0.970 cm^3 (str. 124) i zawiera 0.490 g (49%) wody, która zajmuje 0.490 cm^3 , to po dodaniu do żółtka takiej samej objętości płynu rozcieńczającego otrzymamy, zakładając, że objętość żółtka rozcieńczonego równa się sumie objętości żółtka przed rozcieńczeniem oraz płynu dodanego, z 1 g żółtka 1.940 cm^3 żółtka rozcieńczonego, które będzie zawierać razem 1.460 cm^3 wody, a mianowicie 0.970 cm^3 z płynu oraz 0.490 cm^3 z żółtka. Łatwo obliczyć, że 1.460 cm^3 wody w 1.940 cm^3 żółtka, odpowiada zawartości 0.753 cm^3 w 1 cm^3 .

Analogiczne obliczenia przeprowadziliśmy dla białka, otrzymując dla 33.3% wagowo roztworu białka 0.775 cm^3 wody w 1 cm^3 roztworu.

4. Objętość wody wolnej (*d*).

Wartość tę oznaczano kilkoma metodami. HAMBURGER ('02) oraz EGE ('22) mierzyli objętość krwinek w roztworach o różnej wartości osmotycznej. Wychodząc z założenia, że tylko woda wolna zmienia swą objętość w tych warunkach, z zależności objętości krwinek od wartości osmotycznej roztworów obliczali oni objętość wody wolnej. POLÁNYI ('20), AUGSBERGER ('25) oraz BIALASZEWICZ ('27) podali metodę rozcieńczenia, która polega na oznaczaniu stężenia pewnej substancji w wodzie wolnej najpierw układu nierozcieńczonego, a następnie po rozcieńczeniu. Jeżeli substancja ta rozpuszczała się tylko w wodzie wolnej, to ze zmiany stężenia jej po rozcieńczeniu oraz ze stopnia rozcieńczenia można obliczyć objętość wody wolnej w układzie nierozcieńczonym.

W naszej pracy stosowaliśmy metodę stężenia, którą podał FREDERICQ ('02), a następnie stosował EGE ('22). Opiera się ona na następującym rozumowaniu: jeżeli cały dodany krystaloid rozpuszcza się tylko w wolnej wodzie, to jego stężenie w tym składniku (*u*) pomnożone przez objętość wody wolnej (*d*) będzie równe ilości krystaloidu, zawartej w 1 cm^3 układu, czyli $d \cdot u = c$, stąd znając *c* oraz *u* możemy obliczyć *d* ze wzoru $d = c : u$. Wzór ten, jak widzimy, będzie słuszny tylko wówczas, jeżeli dodany krystaloid rozpuszcza się tylko w wolnej wodzie. W omówieniu wyników doświadczeń podamy wskazówki, któremi kierowaliśmy się przy rozstrzygnięciu tego zagadnienia.

Prócz tej metody, opierającej się na pomiarze wartości *u* i *c*, stosowaliśmy dla porównania inną, w której objętość wody wolnej oblicza się z tarcia wewnętrznego cieczy. EINSTEIN ('06, '11-cyt. wg. KUNITZ'A '26) podał wzór, który ustala zależność pomiędzy lepkością roztworu a objętością ciała rozpuszczonego. W przypadku koloidów hydrofilnych należy przypuszczać, że „objętość ciała rozpuszczonego“ można utożsamiać z objętością koloidu uwodnionego. Jednak wzór EINSTEINA, który w pełnej postaci wygląda jak następuje:

$$\eta = \frac{1 + 0.5 \varphi}{(1 - \varphi)^2},$$

gdzie η oznacza względne tarcie wewnętrzne roztworu w stosunku do rozpuszczalnika, zaś φ stosunek objętości ciała rozpuszczonego do całej objętości roztworu, a więc $1 - d$, nie daje dobrych rezultatów w przypadku roztworów koloidalnych, podobnie jak i wzór HATSCHKA ('11 cyt. wg. KUNITZA '26), a który ma postać następującą:

$$\varphi = \left(\frac{\eta - 1}{\eta} \right)^3$$

Natomiast wzór empiryczny, który podał KUNITZ ('26), daje bardzo dobre wyniki, nawet w bardzo stężonych roztworach koloidalnych. Wobec tego w naszej pracy zastosowaliśmy wzór KUNITZA. Oto ten wzór:

$$\eta = \frac{1 + 0,5 \varphi}{(1 - \varphi)^4}$$

Jak widzimy, różni się on od wzoru EINSTEINA tylko wykładnikiem potęgowym w mianowniku. Oznaczenie lepkości wykonywaliśmy przy pomocy wiskostalagmometru TRAUBEGO, stosując wzór następujący:

$$\eta = \frac{t'd'}{t_w d_w}$$

gdzie t' = czas wypływu cieczy badanej, t_w — czas wypływu wody, d' — gęstość cieczy, d_w — gęstość wody.

5. Stężenie teoretyczne (c_t).

Z definicji stężenia teoretycznego wynika, że jego wartość liczbową otrzymamy, dzieląc c przez v (str. 125).

4. Wyniki doświadczeń.

Doświadczenia nasze można podzielić na cztery grupy w zależności od rodzaju rozmieszczenia badanych substancyj.

A. Cukry.

W pierwszej grupie doświadczeń chodziło nam przede wszystkim o oznaczenie objętości wody wolnej, czyli d . W tym celu oznaczaliśmy iloraz $c:u$ dla szeregu cukrów, o których wiedzieliśmy na podstawie prac EGE'GO ('22) oraz BERCZELLERA ('18), że wykazują one w stosunku do białek t. zw. adsorbcję negatywną, czyli spełniają warunek $u > c_t$ (str. 125). Przypuszczaliśmy mianowicie, że adsorbcja negatywna pochodzi w tym przypadku stąd, że cukry rozpuszczają się tylko w wodzie wolnej. Ażeby upewnić się w tem przypuszczeniu, porównaliśmy wartości ilorazu $c:u$ dla różnych cukrów, gdyż jeżeli wszystkie cukry rozpuszczają się tylko w wodzie wolnej, to iloraz $c:u$ dla każdego z nich musi być równy d , a więc jednakowy dla wszystkich. Ażeby przekonać się, czy wartość ilorazu $c:u$ nie zależy od stężenia cukru, badaliśmy kilka różnych stężeń substancyj.

Najdokładniej zbadaliśmy iloraz $c:u$ dla sacharozy w żółtku rozcieńczonem, w dwóch doświadczeniach po 6 oznaczeń w każdym. Wyniki tych doświadczeń przedstawiają tab. III i IV. Oznaczenia podane są w kolejności wzrastających stężeń cukru. Pierwsze cztery szeregi poziome zawierają wyniki oznaczeń Δ

z jednej strony płynu rozcieńczającego i żółtka rozcieńczonego, nie zawierających sacharozy, z drugiej strony — tychże płynów po dodaniu cukru w stężeniach, które podaje pozycja piąta. Jakżeśmy to opisali w części metodycznej, na podstawie tych danych obliczaliśmy u , stężenie cukru w cieczy międzycząstkowej żółtka, podane w pozycji 6. Pozycja 7 podaje stężenie teoretyczne c_t , które otrzymujemy dzieląc c przez 0.753, czyli przez objętość całej wody, zawartej w 1 cm³ żółtka rozcieńczonego.

Tabela III.

Rozmieszczenie sacharozy w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Doświadczenie 7.
The distribution of sucrose in 50% yolk solutions. Experiment 7.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V	VI	Średnia Mean	
1	Δ	plynu rozcieńczającego without sucrose	Δ ₁	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	
2		of diluting liquid with sucrose	Δ ₂	0.619 ⁰	0.725 ⁰	0.833 ⁰	0.940 ⁰	1.006 ⁰	1.502 ⁰	
3		żółtka without sucrose	Δ ₃	0.502 ⁰	0.502 ⁰	0.502 ⁰	0.502 ⁰	0.502 ⁰	0.502 ⁰	
4		of yolk with sucrose	Δ ₄	0.640 ⁰	0.800 ⁰	0.983 ⁰	1.086 ⁰	1.192 ⁰	1.887 ⁰	
5		w żółtku in yolk	c	18.5	37.0	55.5	74.0	85.5	171.0	
6		Stężenie sacharozy w mg/cm ³ Concentration of sucrose in mg/cc.	u	25.55	53.5	76.0	102.4	121.0	241.4	
7		teoretyczne theoretical	c_t	24.5	49.2	73.8	98.4	113.5	227.0	
8		Przyrost stężenia u w stosunku do c_t absolute	$u - c_t$	+1.0	+4.3	+2.2	+4.0	+7.5	+14.4	
9		Difference between actual concent. u and c_t as per cent of c_t	$100 \frac{u - c_t}{c_t}$	+4.0%	+9.0%	+3.2%	+4.2%	+6.5%	+6.3%	+5.5%
10		Wartość ilorazu Value of quotient	$c : u$	0.725	0.691	0.730	0.723	0.707	0.708	0.714

Pozycja 8 wykazuje przyrost stężenia u (w sensie matematycznym) w stosunku do teoretycznego c_t , jako różnicę $u - c_t$, z której możemy wnioskować o rodzaju rozmieszczenia badanej substancji. Pozycja 9 podaje procentową wartość tego przyrostu w stosunku do c_t , która dla substancyj nieadsorbowanych po-

winna być stała dla wszystkich stężeń tej samej substancji. Wreszcie pozycja 10 zawiera wartości ilorazu $c:u$.

Tabele V i VI, które zawierają dane dotyczące maltozy, glukozy i lewulozy, są zestawione zupełnie tak samo, jak tab. III i IV z tą różnicą, że dla każdego z tych cukrów badano tylko po 3 różne stężenia. Możemy rozpatrywać dane, zawarte w tych czterech tabelach, jednocześnie. A więc przede wszystkim musimy stwierdzić, że we wszystkich oznaczeniach mamy zacho-

Tabela IV.

Rozmieszczenie sacharozy w dwukrotnie rozcieńczonym żółtku. Doświadczenie 8, identyczne z 7.

The distribution of sucrose in 50% yolk solutions. Experiment 8, identical with experiment 7.

№ pozycji Item. №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V	VI	Średnia Mean
1	Δ	plynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez sacharozy without sucrose Δ ₁	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰
2		z sacharozą with sucrose Δ ₂	0.619 ⁰	0.725 ⁰	0.833 ⁰	0.940 ⁰	1.006 ⁰	1.502 ⁰	
3		żółtka of yolk	bez sacharozy without sucrose Δ ₃	0.507 ⁰	0.507 ⁰	0.507 ⁰	0.507 ⁰	0.507 ⁰	0.507 ⁰
4			z sacharozą with sucrose Δ ₄	0.645 ⁰	0.797 ⁰	0.946 ⁰	1.104 ⁰	1.196 ⁰	1.922 ⁰
5		w żółtku in yolk c	18.5	37.0	55.5	74.0	85.5	171.0	
6		Stężenie sacharozy w mg/cm ³ Concentration of sucrose in mg/cc. in yolk	w cieczy międzycząstkowej in the intermicellar fluid u	25.55	52.1	77.5	104.7	121.0	246.6
7		teoretyczne theoretical c _t	24.55	49.2	73.8	98.4	113.5	227.0	
8		Przyrost stężenia u w stosunku do c _t bezwzględny absolute u - c _t	+1.0	+2.9	+3.7	+6.3	+7.5	+19.6	
9		Difference between actual concent. u and c _t procentowy in per cent of c _t 100 $\frac{u-c_t}{c_t}$	+4.0%	+6.0%	+5.1%	+6.5%	+6.5%	+8.6%	+6.1%
10		Wartość ilorazu Value of quotient c : u	0.725	0.710	0.716	0.707	0.707	0.693	0.709

wany warunek $u > c_t$, czyli różnica $u - c_t$ jest stale dodatnia. Wartości procentowego przyrostu stężenia ut w stosunku do c_t wykazują wprawdzie duże wahania, ale wahania te mają przebieg zupełnie niezależny od wielkości stężenia c , tak samo zresztą, jak i wartości ilorazu $c:u$. Stąd możemy wnosić, że objętość wody

wolnej nie zależy od stężenia cukru, a tem samem prawdopodobnie wogóle od jego obecności. Że tak jest można było przypuszczać na podstawie badań LOEBA ('22), który stwierdził, że lepkość roztworu białka nie zmienia się po dodaniu cukru. Dalej możemy się przekonać, że różnice pomiędzy średnimi wartościami ilorazu $c : u$ dla różnych substancyj nie przekraczają różnic, jakie wykazują dane dla tej samej substancji w różnych oznaczeniach. Np. tab.

Tabela V.

Rozmieszczenie maltozy w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Doświadczenie 10.
The distribution of maltose in 50% yolk solutions. Experiment 10.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	Średnia Mean	
1	Δ	płynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez maltozy without maltose	Δ ₁	0.413 ⁰	0.492 ⁰	0.413 ⁰
2		z maltozą with maltose	Δ ₂	0.611 ⁰	0.968 ⁰	1.281 ⁰	
3		żółtka of yolk	bez maltozy without maltose	Δ ₃	0.440 ⁰	0.440 ⁰	0.440 ⁰
4			z maltozą with maltose	Δ ₄	0.720 ⁰	1.106 ⁰	1.635 ⁰
5	Stężenie maltozy w mg/cm ³ Concentration of maltose in mg/cc.	w żółtku in yolk	c	40.0	92.4	166.7	
6		w cieczy międzycząstk. in the intermicellar fluid	u	55.5	128.6	229.5	
7		teoretyczne theoretical	c _t	53.1	122.8	221.3	
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c _t	bezwzględny absolute	u - c _t	+2.4	+5.8	+8.2	
9	Difference between actual concent. u and c _t	procentowy as per cent of c _t	100 $\frac{u - c_t}{c_t}$	+4.5%	+4.7%	+3.7%	+4.3%
10	Wartość ilorazu Value of quotient	c : u		0.721	0.719	0.726	0.722

III podaje wahania ilorazu $c : u$ od 0.691 do 0.730, zaś średnie dla różnych cukrów wahają się w granicach od 0.709 do 0.727, a więc w granicach znacznie mniejszych. Wobec tego możemy przyjąć, że wartości ilorazu $c : u$ są w granicach błędu doświadczenia jednakowe dla wszystkich zbadanych przez nas cukrów. Średnia ogólna dla wszystkich cukrów wynosi 0.719, wobec czego możemy przyjąć, że objętość wody wolnej wynosi około 0.719 cm³ w 1 cm³ żółtka dwukrotnie rozcieńczonego. Wobec tego, że

cała woda zajmuje około 0.753 cm^3 , woda związana zajmuje około 0.034 cm^3 , co stanowi 4.4% całej wody.

Ażeby przekonać się, czy fakt, że cukry rozpuszczają się tylko w wodzie wolnej, jest zjawiskiem ogólnym dla różnych rozтворów koloidalnych, czy też tylko indywidualną właściwością rozcieńczonego żółtka, pozostającą może w związku z tem, że

Tabela VI.

Rozmieszczenie glukozy (dośw. 11) i lewulozy (dośw. 12) w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem.
The distribution of glucose (exper. 11) and laevulose (exper. 12) in 50% yolk solutions.

Item. №	№ doświadczenia i rodzaj substancji of experiment and substance used		№ 11. Glukoza Glucose				№ 12. Lewuloza Laevulose			
	№ oznaczenia of determination		I	II	III	Średnia Mean	I	II	III	Średnia Mean
1	Δ	plynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez substancji without substance Δ ₁	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.413 ⁰	0.492 ⁰	0.413 ⁰	
2		z substancją with substance Δ ₂	0.699 ⁰	1.021 ⁰	1.332 ⁰	0.613 ⁰	1.000 ⁰	1.250 ⁰		
3		żółtka of yolk	bez substancji without substance Δ ₃	0.424 ⁰	0.424 ⁰	0.424 ⁰	0.424 ⁰	0.424 ⁰	0.424 ⁰	
4		z substancją with substance Δ ₄	0.708 ⁰	1.142 ⁰	1.577 ⁰	0.710 ⁰	1.124 ⁰	1.559 ⁰		
5	Stężenie substancji w mg/cm ³ Concentration of substance in mg/cc.	w żółtku in yolk c	20.0	50.0	80.0	20.0	48.65	80.0		
6		w cieczy międzykomórkowej in the intercellular fluid u	28.0	69.1	111.0	27.9	67.0	108.5		
7		teoretyczne theoretical c _t	26.6	66.4	106.2	26.6	64.6	106.2		
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c _t Difference between actual concentration u and c _t	bezwzględny absolute u-c _t	+1.4	+2.7	+4.8	+1.3	+2.4	+2.3		
9		procentowy as per cent of c _t $\frac{u-c_t}{c_t} \cdot 100$	+5.4%	+4.0%	+4.6%	+4.7%	+5.0%	+3.6%	+2.1%	+3.6%
10	Wartość ilorazu Value of quotient c : u		0.715	0.724	0.721	0.720	0.717	0.726	0.737	0.727

żółtko przedstawia zawiesinę ziarenek deutoplazmatycznych, przeprowadziliśmy analogiczne badania w roztworze białka. Wyniki tych badań przedstawia tab. VII. Dotyczy ona rozmieszczenia sacharozy, glukozy oraz galaktozy w roztworze białka. Poszczególne pozycje są zestawione w ten sam sposób, jak i tabele, dotyczące rozmieszczenia cukrów w żółtku. I tu również możemy

T a b e l a VII.

Rozmieszczenie sacharozy (Dośw. 13), glukozy (Dośw. 14) oraz galaktozy (Dośw. 15) w roztworze białka.
The distribution of sucrose (Exper. 13), glucose (Exper. 14) and galactose (Exper. 15) in solutions of ovalbumine.

№ pozycji Item №	№ doświadczenia i rodzaj substancji of experiment and substance used	№ 13. Sacharoza Sucrose			№ 14. Glukoza Glucose			№ 15. Galaktoza Galactose				
		I	II	III	Średnia Mean	I	II	III	Średnia Mean	I	II	Średnia Mean
1	płynu roz- cieńczającego of diluting liquid	Δ ₁	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰	0.501 ⁰
2		Δ ₂	0.725 ⁰	1.006 ⁰	1.502 ⁰	0.699 ⁰	1.021 ⁰	1.352 ⁰	0.990 ⁰	1.296 ⁰		
3	roztworu białka of solution of ovalbumine	Δ ₃	1.411 ⁰	1.411 ⁰	1.411 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰	1.393 ⁰
4		Δ ₄	1.684 ⁰	2.106 ⁰	2.829 ⁰	1.690 ⁰	2.130 ⁰	2.540 ⁰	2.077 ⁰	2.514 ⁰		
5	Stężenie substancji w mg/cm ³ Concentration of substance in mg/cc.	c	37.0	85.5	171.0	20.0	50.0	80.0	50.0	80.0	80.0	80.0
6		u	49.2	121.8	247.2	29.3	70.9	110.4	68.9	112.8		
7	c _t	47.7	110.3	220.6	25.8	64.5	103.2	64.5	103.2			
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c _t Difference between actual concentra- tion u and c _t	u-c _t	+1.5	+11.5	+26.6	+3.5	+6.4	+7.2	+4.4	+9.6		
9		$100 \frac{u-c_t}{c_t}$	+3.1%	+10.4%	+12.0%	+8.5	+9.9%	+10.1%	+6.9%	+9.3%	+8.1%	
10	Wartość ilorazu Value of quotient	c : u	0.752	0.762	0.692	0.715	0.705	0.725	0.704	0.725	0.709	0.717

stwierdzić po pierwsze, że $u - c_t$ jest stale dodatnie, po drugie, że procentowy przyrost u w stosunku do c_t nie zależy od stężenia, i wreszcie, że średnie dla ilorazu $c : u$ różnych cukrów różnią się znacznie mniej pomiędzy sobą, niż poszczególne oznaczenia tej samej substancji. Wobec tego, możemy przyjąć, że objętość wody wolnej w roztworze białka równa się ogólnej śred-

Tabela VIII.

Rozmieszczenie mocznika w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Dośw. 9.
The distribution of urea in 50% yolk solutions. Experiment 9.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V	VI	Średnia Mean	
1	Δ	bez mocznika without urea	Δ ₁	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.521 ⁰	0.492 ⁰	0.492 ⁰	0.492 ⁰	
2		z mocznikiem with urea	Δ ₂	0.621 ⁰	0.719 ⁰	0.823 ⁰	0.890 ⁰	0.986 ⁰	1.475 ⁰	
3		bez mocznika without urea	Δ ₃	0.495 ⁰	0.495 ⁰	0.495 ⁰	0.495 ⁰	0.495 ⁰	0.495 ⁰	
4		z mocznikiem with urea	Δ ₄	0.625 ⁰	0.758 ⁰	0.902 ⁰	1.000 ⁰	1.135 ⁰	1.730 ⁰	
5	Stężenie mocznika w mg/cm ³ Concentration of urea in mg/cc.	w żółtku in yolk	<i>c</i>	3.246 ⁰	6.492	9.738	12.98	16.23	32.46	
6		w cieczy między- cząstkowej in the intermicellar fluid	<i>u</i>	4.242	8.620	13.32	16.63	21.08	40.69	
7		teoretyczne theoretical	<i>c_t</i>	4.311	8.622	12.93	17.24	21.55	43.10	
8	Przyrost stężenia <i>u</i> w stosunku do <i>c_t</i>	bezwzględny absolute	$u - c_t$	-0.069	-0.002	+0.39	-0.61	-0.47	-2.41	
9	Difference between actual concent. <i>u</i> and <i>c_t</i>	procentowy as per cent of <i>c_t</i>	$\frac{u - c_t}{c_t} \cdot 100$	-1.6%	0.0	(+3.0)	-3.6%	-2.2%	-5.6%	-2.6%
10	Wartość ilorazu Value of quotient $c : u$			0.765	0.753	(0.731)	0.781	0.770	0.798	0.773

niej wartości $c : u$ i wynosi 0.712 cm³ w 1 cm³ 33.3% wagowo roztworu białka. Ponieważ objętość całej wody zawartej w 1 cm³ roztworu wynosiła 0.775 cm³, więc objętość wody związanej równała się 0.063 cm³, co odpowiada około 8.1% całej wody. Jak widzimy, roztwór albuminy, przy prawie tej samej zawartości wody całkowitej, co i żółtko rozcieńczone (0.753 i 0.775 cm³ w jednym cm³ roztworu) zawierał prawie dwa razy więcej wody związanej (0.063 cm³ i 0.034 cm³ w 1 cm³ roztworu).

B. Mocznik.

Tabela VIII podaje dane, dotyczące rozmieszczenia mocznika w żółtku rozcieńczonem. Tabela jest ułożona w ten sam sposób, jak tabele, obejmujące dane dla cukrów. Widzimy, że 4 z pośród 6 oznaczeń wykazują $u < c_t$, czyli $u - c_t$ ujemne, w jednym przypadku mamy $u = c_t$, a tylko w jednym $u > c_t$. Odpowiednio do tego iloraz $c : u$ jest naogół większy od v , czyli od ob-

Tabela IX.

Rozmieszczenie mocznika w roztworze białka. Doświadczenie 16.
The distribution of urea in solutions of ovalbumine. Experiment 16.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	Średnia Mean	
1	płynu roz- cieńczającego of diluting liquid	bez mocznika without urea	Δ_1	0.521 ⁰	0.492 ⁰	0.492 ⁰	
		z mocznikiem with urea	Δ_2	0.719 ⁰	0.986 ⁰	1.475 ⁰	
	białka of ovalbumine	bez mocznika without urea	Δ_3	1.411 ⁰	1.411 ⁰	1.411 ⁰	
		z mocznikiem with urea	Δ_4	1.638 ⁰	1.950 ⁰	2.546 ⁰	
5	Stężenie mocznika w mg/cm ³ Concentration of urea in mg/cc.	w białku in ovalbumine	c	6.493	16.23	32.46	
6		w cieczy międzycząst. in the intermicellar fluid	u	7.382	17.75	37.48	
7		teoretyczne theoretical	c_t	8.378	20.94	41.88	
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c_t Difference between actual concentra- tion u and c_t	bezwzględny absolute	$u - c_t$	0.996	3.19	4.40	
9		procentowy as per cent of c_t	$100 \frac{u - c_t}{c_t}$	-11.9%	-15.2%	-10.5%	-12.5%
10	Wartość ilorazu Value of quotient	$c : u$		0.879	0.914	0.866	0.886

jętości całej wody. Wynika z tego, że część mocznika znajduje się poza wodą wolną, jednak nie wiemy, czy jest ona związana przez koloid, czy też jest rozpuszczona w wodzie związanej. W tym drugim przypadku musielibyśmy przyjąć, że mocznik rozpuszcza się w wodzie związanej więcej, niż w wodzie wolnej. Niezależność stopnia wiązania od stężenia, którą możemy stwierdzić, przeglądając procent mocznika związanego, przemawia

przeciw adsorbcji, a raczej za rozpuszczaniem się mocznika w fazie koloidalnej. Tu jednak nasunęły się dwie możliwości: 1° mocznik może się rozpuszczać w wodzie związanej, albo też 2° w lipoidach, które — jak wiadomo — występują w dużych ilościach w żółtku jaj kurzych. Ażeby rozstrzygnąć tę wątpliwość, wykonaliśmy oznaczenia rozmieszczenia mocznika w roztworze białka, co do którego przekonaliśmy się, że nie zawiera ciał rozpuszczalnych w eterze. Wyniki tych badań przedstawia tab. IX, zestawiona w sposób analogiczny do poprzednich. Wykonaliśmy tylko trzy oznaczenia, ale wszystkie zgadzają się dobrze, wykazując, że mocznik jest związany jeszcze silniej, niż w żółtku. Przeczy to przypuszczeniu, jakoby rozpuszczalność mocznika w tłuszczach była miarodajna dla jego wiązania w żółtku. Z drugiej strony fakt, że objętość wody związanej jest większa w roztworze białka, a zarazem i stopień wiązania mocznika jest większy, czyni prawdopodobnym, że wiązanie mocznika w układach koloidalnych polega na jego większej rozpuszczalności w wodzie związanej.

C. Chlorki alkaliów.

Przechodzimy teraz do wyników, dotyczących rozmieszczenia soli katjonów jednowartościowych w żółtku rozcieńczonem. Tab. X przedstawia dane dla NaCl. Obejmuje ona zarówno wyniki otrzymane metodą krjoskopową, jak i ultrafiltracyjną. Część pierwsza tabeli, zawierająca dane krjoskopowe, jest zestawiona zupełnie tak samo, jak tabele dla sacharozy. Część druga podaje ogólne stężenie chloru, dodanego jako NaCl do rozcieńczonego żółtka, oznaczone przez c' , dalej zawartość chloru w przesączu samego żółtka w mg na 1 cm^3 przesączu, oznaczone przez c'_1 , następnie ogólne stężenie chloru w przesączach po dodaniu NaCl oznaczone przez c'_2 , pozycja czwarta podaje stężenie chloru dodanego w przesączu, obliczone z różnicy $c'_2 - c'_1$, a oznaczone przez u' dalej pozycja piąta zawiera wartości teoretycznego stężenia dodanego chloru c'_t , otrzymane z podzielenia c' przez objętość całej wody, zawartej w 1 cm^3 żółtka. Pozycja szósta i siódma części drugiej wskazują przyrosty stężenia znalezione u' w stosunku do c'_t , najpierw jako różnicę $u' - c'_t$, a potem procentowo. Wreszcie ostatnia kolumna pozioma podaje wartość ilorazu $c' : u'$.

Rozpatrzymy najpierw wyniki metody krjoskopowej. Z pośród pięciu oznaczeń dwa wykazują u mniejsze od c_t , zaś trzy

Tabela X.

Rozmieszczenie NaCl w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Doświadczenie 18.
The distribution of NaCl in 50% yolk solutions. Experiment 18.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V	Średnia Mean	
1	Δ	płynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez NaCl without NaCl	Δ_1	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰
2		z NaCl with NaCl	Δ_2	0.588 ⁰	0.801 ⁰	0.985 ⁰	1.291 ⁰	1.535 ⁰	
3		żółtka of yolk	bez NaCl without NaCl	Δ_3	0.430 ⁰	0.430 ⁰	0.430 ⁰	0.430 ⁰	0.430 ⁰
4			z NaCl with NaCl	Δ_4	0.676 ⁰	0.938 ⁰	1.186 ⁰	1.602 ⁰	1.946 ⁰
5	Stężenie NaCl w mg/cm ³ Concentration of NaCl in mg/cc.	w żółtku in yolk	c	3.33	6.66	10.00	15.00	20.00	
6		w cieczy międzycząstk. in the intermicellar fluid	u	4.46	8.80	13.07	20.45	27.02	
7		teoretyczne theoretical	c_t	4.43	8.85	13.28	19.92	26.56	
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c_t Difference between actual concent. u and c_t	bezwzględny absolute	$u - c_t$	+0.03	-0.05	-0.21	+0.53	+0.46	
9		procentowy as per cent of c_t	$100 \frac{u - c_t}{c_t}$	+0.66%	-0.6%	-1.6%	+2.7%	+1.7%	+0.8%
10	Wartość ilorazu Value of quotient		$c : u$	0.748	0.757	0.765	0.734	0.740	0.749
11	Ilość Cl dodanego jako NaCl w mg/cm ³ żółtka Amount of Cl added as KCl in mg/cc.		c'	2.02	4.04	6.07	9.10	12.13	
12	Stężenie Cl w mg/cm ³ w przesączu Concentration of Cl in mg/cc. in the ultrafiltrate	żółtka rozcieńzonego of diluted yolk	c_1	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	
13		żółtka po dodaniu soli of yolk after addition of salt	c_2	6.07	9.10	11.37	15.60	18.65	
14		dodanej soli of added salt	$u' = c_2 - c_1$	2.59	5.62	7.89	12.12	15.17	
15		teoretyczne theoretical	c'_t	2.68	5.37	8.05	12.08	16.11	
16	Przyrost stęż. u' w stosun. do c'_t Difference between actual concentration u' and c'_t	bezwzględny absolute	$u' - c'_t$	-0.09	+0.25	-0.16	+0.04	-0.94	
17		procentowo as per cent of c'_t	$100 \frac{u' - c'_t}{c'_t}$	-3.5%	+4.7%	-2.0%	+0.3%	-5.8%	-1.3%
18	Wartość ilorazu Value of quotient		$c' : u'$	0.780	0.719	0.769	0.751	0.799	0.764

u większe od c_t , jednak we wszystkich pięciu przypadkach procentowy przyrost u w stosunku do c_t ma tak małą wartość bez-

Tabela XI.

Rozmieszczenie KCl w żółtku dwukrotnie rozcieńczonym. Doświadczenie 19.
The distribution of KCl in 50% yolk solutions. Experiment 19.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V	Średnia Mean
1	Δ	plynu rozcieńczającego of diluting liquid bez KCl without KCl Δ ₁	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰	0.413 ⁰	
2		z KCl with KCl Δ ₂	0.606 ⁰	0.813 ⁰	1.014 ⁰	1.243 ⁰	1.447 ⁰	
3		żółtka of yolk bez KCl without KCl Δ ₃	0.431 ⁰	0.431 ⁰	0.431 ⁰	0.431 ⁰	0.431 ⁰	
4		z KCl with KCl Δ ₄	0.686 ⁰	0.943 ⁰	1.222	1.507 ⁰	1.809 ⁰	
5	Stężenie KCl w mg/cm ³ Concentration of KCl in mg/cc.	w żółtku in yolk c	4.33	8.67	13.33	18.33	23.33	
6		w cieczy międzycząstk. in the intercellular fluid u	5.63	11.24	17.50	24.28	31.10	
7		teoretyczne theoretical c _t	5.76	11.51	17.70	24.35	30.99	
8	Przyrost stężenia u w stosunku do c _t Difference between actual concent. u and c _t	bezwzględny absolute u - c _t	-0.13	-0.27	-0.20	-0.07	+0.11	-1.6%
9		procentowy as per cent of c _t 100 $\frac{u-c_t}{c_t}$	-2.3%	-2.4%	-1.15%	-0.3%	0.35%	1.16%
10	Wartość ilorazu Value of quotient c : u		0.770	0.771	0.762	0.755	0.750	0.761
11	Ilość Cl dodanego jako KCl w mg/cm ³ żółtka Amount of Cl added as KCl in mg/cc of yolk c'		2.06	4.12	6.34	8.72	—	
12	Stężenie Cl w mg/cm ³ w przesączu Concentration of Cl in mg/cc in the ultrafiltrate	żółtka rozcieńczonego of diluted yolk c' ₁	3.77	3.77	3.77	3.77	—	
13		żółta po dodaniu soli of yolk after addition of salt c' ₂	6.46	9.18	12.45	15.05	—	
14		dodanej soli of added salt u'	2.69	5.41	8.68	11.28	—	
15		teoretyczne theoretical c' _t	2.74	5.47	8.42	11.58	—	
16	Przyrost stęż. u' w stos. do c' _t Difference between actual concentration u' and c' _t	bezwzględny absolute u' - c' _t	-0.05	-0.06	+0.26	-0.30	—	
17		procentowy as per cent of c' _t 100 $\frac{u'-c'_t}{c'_t}$	-1.8%	-1.1%	+3.1%	-2.6%	—	-0.6%
18	Wartość ilorazu Value of quotient c' - u'		0.766	0.762	0.731	0.773	—	0.758

względna, że możemy uznać te odchylenia od zera jako wyniki błędów metody. Podobnież iloraz $c:u$ różni się tak nieznacznie od 0.753, czyli objętości całej wody, zawartej w układzie, że

Tabela XII.

Rozmieszczenia CaCl_2 w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Doświadczenie 21.
The distribution of CaCl_2 in 50% yolk solutions. Experiment 21.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V		
1	Δ	plynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez CaCl_2 without CaCl_2	Δ_1	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰
2		z CaCl_2 with CaCl_2	Δ_2	0.653 ⁰	0.920 ⁰	1.188 ⁰	1.386 ⁰	1.610 ⁰	
3		żółtka of yolk	bez CaCl_2 without CaCl_2	Δ_3	0.480 ⁰	0.480 ⁰	0.480 ⁰	0.480 ⁰	0.480 ⁰
4		z CaCl_2 with CaCl_2	Δ_4	0.716 ⁰	1.065 ⁰	1.393 ⁰	1.665 ⁰	1.933 ⁰	
5	Stężenie substancji w mg/cm^3 Concentration of substance in mg/cc		w żółtku in yolk	c	6.15	12.29	18.44	23.08	27.67
6			w cieczy międzycząstk. in the intermicel. fluid	u	5.69	13.72	21.32	27.36	33.16
7	Ilość substancji związanej przez koloid Amount of substance bound by the colloid		w $\text{mg w } 1 \text{ cm}^3$ żółtka in mg/cc of yolk	$c - uv$	1.87	1.96	2.39	2.48	2.70
8			w procentach ilości dodanej as per cent of the amount added	$\frac{c-uv}{c} 100$	30.3%	16.0%	12.9%	10.7%	9.7%
9	Ilość Cl dodanego jako CaCl_2 w mg/cm^3 żółtka Amount of Cl added as CaCl_2 in mg/cc of yolk			c'	3.93	7.86	11.80	14.75	17.70
10	Stężenie Cl w przesączu Concentration of Cl in mg/cc in the ultrafiltrate		żółtka bez CaCl_2 of yolk without CaCl_2	c'_1	4.44	4.44	4.44	4.44	4.44
11			żółtka z CaCl_2 of yolk with CaCl_2	c'_2	7.93	14.16	18.00	21.95	26.23
12			Cl dodany jako CaCl_2 Cl added as CaCl_2	$u' = c'_2 - c'_1$	3.49	8.77	13.56	17.51	21.79
13	Ilość Cl związanego przez koloid Amount of Cl bound by the colloid		w $\text{mg w } 1 \text{ cm}^3$ żółtka in mg/cc of yolk	$c' - u'v$	1.30	1.26	1.59	1.57	1.29
14			w procentach Cl dodanego as per cent of the amount added	$\frac{c' - u'v}{c'} 100$	33.2%	16.1%	13.5%	10.6%	7.2%

możemy przyjąć z dużym prawdopodobieństwem, że NaCl rozpuszcza się równomiernie w całej wodzie. Podobne wyniki otrzymali BUGARSKY i LIEBERMANN ('98) oraz FREDERICQ ('01) w roz-

tworach albuminy jaj. Zupełnie to samo możemy stwierdzić w stosunku do danych, otrzymanych metodą ultrafiltracyjną, z tą tylko różnicą, że metoda ta daje większe błędy. Wynika stąd,

Tabela XIII.

Rozmieszczenie $MgCl_2$ w żółtku dwukrotnie rozcieńczonem. Doświadczenie 22.
The distribution of $MgCl_2$ in 50% yolk solutions. Experiment 22.

№ pozycji Item №	№ oznaczenia of determination		I	II	III	IV	V		
1	Δ	plynu rozcieńczającego of diluting liquid	bez $MgCl_2$ without $MgCl_2$	Δ_1	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰	0.398 ⁰
2		z $MgCl_2$ with $MgCl_2$	Δ_2	0.687 ⁰	0.963	1.178 ⁰	1.336 ⁰	1.587 ⁰	
3		żółtka of yolk	bez $MgCl_2$ without $MgCl_2$	Δ_3	0.440 ⁰	0.440 ⁰	0.440 ⁰	0.440 ⁰	0.440 ⁰
4			z $MgCl_2$ with $MgCl_2$	Δ_4	0.780 ⁰	1.119 ⁰	1.411 ⁰	1.634 ⁰	1.907 ⁰
5	Stężenie $MgCl_2$ w mg/cm^3 Concentration of $MgCl_2$ in $mg/cc.$	w żółtku in yolk	c	5.15	10.30	13.73	17.17	20.60	
6		w cieczy międzycząstk. in the intermicel. fluid	u	6.13	12.17	17.22	20.68	25.41	
7	Ilość $MgCl_2$ związanego przez koloid Amount of $MgCl_2$ bound by the colloid	w mg w $1 cm^3$ żółtka in $mg/cc.$ of yolk	$c - uv$	0.53	1.13	0.77	1.59	1.47	
8		w procentach ilości dodanej as per cent of the amount added	$\frac{c - uv}{c} 100$	10.4%	11.0%	5.6%	9.2%	7.1%	
9	Ilość Cl dodanego jako $MgCl_2$ w mg/cm^3 żółtka Amount of Cl added as $MgCl_2$ in mg/cc of yolk		c'	3.89	7.77	10.37	12.96	15.55	
10	Stężenie Cl w mg na cm^3 w przesączu Concentration of Cl in mg/cc in the ultrafil- trate	żółtka bez $MgCl_2$ of yolk without $MgCl_2$	c_1	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	
11		żółtka z $MgCl_2$ of yolk with $MgCl_2$	c_2	8.75	12.96	16.03	19.19	23.58	
12		Cl dodanego ja- ko $MgCl_2$ Cl added as $MgCl_2$	$u' = c_2 - c_1$		4.59	8.80	11.87	15.03	19.42
13	Ilość Cl zwią- zanego przez koloid Amount of Cl bound by the colloid	w mg w $1 cm^3$ żółtka in mg/cc of yolk	$c' - u'v$	0.43	1.15	1.43	1.64	0.93	
14		w procentach Cl dodanego as per cent of the amount added	$\frac{c' - u'v}{c'} 100$	11.0%	14.8%	13.8%	12.6%	5.9%	

że oba jony zachowują się jednakowo i rozpuszczają się równomiernie w całej wodzie układu.

Tab. XI zestawiona tak samo jak X podaje wyniki, doty-

czące rozmieszczenia KCl w żółtku rozcieńczonem. Tutaj wyniki metody krjoskopowej nasuwają pewne wątpliwości. Wprawdzie procentowe przyrosty u w stosunku do c_t , co do swej bezwzględnej wartości, nie przewyższają takichże przyrostów w przypadku NaCl, ale natomiast wykazują pewną prawidłowość. Tak więc pierwsze cztery oznaczenia w kolejności wzrastających stężeń wykazują przyrosty ujemne, a przytem wartość bezwzględna tych przyrostów maleje naogół ze zwiększeniem stężenia. Być może więc, że mamy tu do czynienia z bardzo nieznaczną adsorbacją KCl. Ponieważ jednak przyrosty pozostają całkowicie w granicach błędu, zaś z drugiej strony dane ultrafiltracyjne nie wykazują żadnej prawidłowości, musimy uznać za bardziej prawdopodobne, że KCl podobnie jak i NaCl, rozpuszcza się równomiernie w całej wodzie układu.

D. Chlorki ziem alkalicznych.

Tabele XII i XIII obejmują wyniki dotyczące chlorków metali dwuwartościowych.

Wobec tego, że wiązanie tych soli przez koloid wydaje się niewątpliwem, zmieniliśmy układ tych tabel w porównaniu z X i XI. Pierwsze sześć pozycji odpowiada takim samym pozycjom poprzednich tabel, podobnie pozycje 9, 10, 11 i 12 odpowiadają pozycjom 11, 12, 13 i 14 tabeli X. Natomiast w pozycji 7 podajemy ilość soli związanej przez koloid jako różnicę między ilością soli dodanej do 1 cm³ żółtka, a ilością zawartą w całej wodzie. Tę ostatnią ilość uważaliśmy za równą iloczynowi stężenia u przez objętość całej wody v , wychodząc z założenia, że niezwiązana część soli jest, podobnie jak NaCl i KCl, rozpuszczona równomiernie w całej wodzie. Wobec tego ilość substancji związanej przez koloid będzie równa $c - uv$. Pozycja 8 podaje, jaki procent całej ilości dodanej stanowi ilość związana, co obliczamy na podstawie wzoru $\frac{c - uv}{c} \cdot 100$. Zupełnie analogiczne wartości dla chloru podają pozycje 13 i 14.

Przeglądając liczby podane w tych pozycjach, musimy stwierdzić, że mamy tutaj niewątpliwe i bardzo znaczne wiązanie, przy czem wykazujące w przybliżeniu charakter izotermy adsorbacyjnej. Uderzająca jest zgodność wyników, otrzymanych metodą

krjoskopową i ultrafiltracyjną. Dowodzi to, że oba jony są w tym samym stopniu wiązane. Ten sam wniosek nasuwają dane, przedstawione w tabeli II (kolumna pionowa trzecia). Widzimy tam, że przesącz żółtka rozcieńczonego, zawierającego CaCl_2 w stężeniu, wykazującym największe procentowe wiązanie, wykazuje Δ takie samo, jak żółtko przed sączeniem, czyli ogólne stężenie jonów jest identyczne w wodzie wolnej żółtka i w przesączu.

Tabela XIV.

Porównanie objętości cieczy międzycząstkowej dwukrotnie rozcieńczonego żółtka oraz roztworu białka, obliczonych na podstawie ich lepkości z wartością d tych roztworów. Doświadczenie 23 i 24.

Comparison of the values of d obtained for 50% egg-yolk and for ovalbumin solutions with the values calculated for the volumes of the intermicellar fluid from viscosity considerations.

№ pozycji Item №	Rodzaj układu koloidalnego Colloidal system used	Żółtko Yolk	Białko White
1	Czas wypływu ze stalagmometru w sekund. <i>The time of outflow from the stalagmometer in seconds</i>	79.0	79.0
2	wody <i>of water</i> t_w roztworu koloidal. <i>of colloidal solution</i> t'	393 (392, 392, 395)	350 (345, 349, 355)
3	Gęstość roztworu koloidalnego <i>Density of colloidal solution</i> s	1.015	1.088
4	Względna lepkość roztworu wg. wzoru <i>Relative viscosity of solution according to the formula</i> $\tau = \frac{t's}{t_w}$	5.05	4.82
5	Objętość cieczy międzycząstkowej wg. wzoru Kunitza <i>Volume of intermicellar fluid calculated according to the formula of Kunitz</i> $\tau_1 = \frac{1+0.5\varphi}{(1-\varphi)^2}$	0.692	0.699
6	Objętość wody wolnej <i>Volume of free water</i> d	0.719	0.712

Tabela XIII podaje wyniki, dotyczące MgCl_2 . I tu, podobnie jak w przypadku CaCl_2 , mamy niewątpliwie wiązanie, wykazujące charakter izotermy adsorbcyjnej, jednak błędy oraz różnice wyników metod krjoskopowej i ultrafiltracyjnej są dużo większe, niż dla CaCl_2 . Naogół można przypuszczać, że MgCl_2 jest wiązane w podobny sposób, jak i CaCl_2 , lecz w mniejszym stopniu, jakkolwiek wyniki dla MgCl_2 są znacznie mniej wyraźne, niż dla CaCl_2 .

E. Objętość cieczy międzycząstkowej.

Ażeby przekonać się, o ile zgadzają się dane, dotyczące objętości cieczy międzycząstkowej, otrzymane metodami różnemi, obliczyliśmy ją również z lepkości roztworów koloidalnych, posługując się wzorem KUNITZA ('26). Tabela XIV przedstawia wyniki tych badań. Początkowe pozycje tabeli zawierają dane, potrzebne do obliczenia lepkości roztworów, a mianowicie czas wpływu ze stalagmometru (str. 131) wody t_w , względnie cieczy badanych, t' oraz gęstość roztworów koloidalnych. Gęstość wody przyjęliśmy za równą jedności. Pozycja czwarta podaje lepkość, obliczoną na podstawie tych danych, zaś pozycja piąta objętość cieczy międzycząstkowej, odpowiadającą tej lepkości według wzoru KUNITZA. Porównywając d , otrzymane z ilorazu $c:u$ dla cukrów, z objętością cieczy międzycząstkowej, otrzymaną wg. wzoru KUNITZA, musimy uznać, że, uwzględniając duże błędy przy oznaczaniu lepkości w roztworach, zawierających stosunkowo duże ziarnka deutoplazmatyczne, jak w żółtku rozcieńczonem, względnie duże stężenie białka, — wyniki otrzymane różnemi metodami są nadspodziewanie zgodne, zwłaszcza w roztworze białka. Wyniki te potwierdzają zarazem słuszność wzoru empirycznego KUNITZA, w przeciwieństwie do wzorów EINSTEINA oraz HATSHECKA, które dają wartości zupełnie nieprawdopodobne.

5. Omówienie wyników.

W pracy naszej zwróciliśmy uwagę przedewszystkiem na dwie kwestje, a mianowicie — po pierwsze — na objętości, jakie zajmują w układzie koloidalnym hydrofilnym woda wolna, woda związana oraz koloid, a po drugie — na rozmieszczenie krystaloidów w każdym z tych składników układu. Opierając się na właściwościach cukrów, obliczyliśmy prawdopodobne objętości każdego ze składników, a mianowicie: w żółtku rozcieńczonem objętość wody wolnej według naszych obliczeń stanowiła 71.9%, objętość wody związanej 3.4%, zaś objętość koloidu 24.7% całej objętości układu. W 33.3% wagowo roztworze białka objętości te stanowiły odpowiednio 71.2%, 6.3% oraz 22.5% całej objętości roztworu.

W ten sposób pierwsze zagadnienie możemy uważać za rozwiązane. Natomiast zagadnienie rozmieszczenia poszczególnych krystaloidów w różnych częściach układu udało nam się rozwiązać tylko częściowo. Mianowicie co do cukrów możemy stwierdzić z dużą dozą prawdopodobieństwa, że rozpuszczają się one tylko w wodzie wolnej, natomiast wcale nie przechodzą ani do wody związanej, ani do koloidu. Dla NaCl oraz KCl stwierdziliśmy, że rozpuszczają się one równomiernie zarówno w wodzie wolnej, jak i w związanej, natomiast nie są one wiązane przez koloid. Co się tyczy CaCl_2 oraz MgCl_2 , to możemy uznać za bardzo prawdopodobne, że występują one we wszystkich trzech składnikach, przy czym w wodzie wolnej oraz związanej prawdopodobnie wykazują one jednakowe stężenie, podobnie jak NaCl i KCl, natomiast w koloidzie występują w stężeniach zmiennych, zależnych od ogólnego stężenia soli w układzie, i różnych niż stężenia w wodzie.

Wyniki, dotyczące rozmieszczenia tych trzech grup związków, możemy uznać za równie prawdopodobne, jak i wyniki dotyczące objętości poszczególnych składników układu. Natomiast co do mocznika, to wprawdzie wysunęliśmy przypuszczenie, że występuje on tylko w wodzie, przy czym w wodzie związanej więcej, niż w wodzie wolnej, jednak musimy stwierdzić, że przypuszczenie to opiera się na mniej przekonujących dowodach, niż poglądy nasze, dotyczące rozmieszczenia pozostałych związków. Jedynie niewątpliwym jest fakt, że mocznik częściowo znika z wody wolnej. Ponieważ jednak całkowite rozstrzygnięcie tej sprawy byłoby możliwe tylko wówczas, gdybyśmy mogli określić stężenie dodanej substancji w wodzie związanej, a co wobec braku odpowiednich metod jest narazie niewykonalne, musimy poprzestać na wskazówkach pośrednich, przytoczonych w poprzednim rozdziale.

Wniośki.

1°. Cukry, a mianowicie sacharoza, maltoza, glukoza, galaktoza i fruktoza zarówno w żółtku rozcieńczonym, jak i w roztworze białka kurzego, rozpuszczają się tylko w wodzie wolnej

układu. Dzięki tej właściwości cukrów mogliśmy oznaczyć objętość wody wolnej, a zarazem i związanej obu badanych układów koloidalnych.

2°. Mocznik rozpuszcza się nietylko w wodzie wolnej rozcieńczonego żółtka i roztworu białka.

3°. Chlorki alkaliów, a mianowicie NaCl i KCl, rozpuszczają się równomiernie w całej wodzie układu. Przez sam koloid wiązane nie są.

4°. Chlorki ziem alkalicznych, mianowicie CaCl₂ i MgCl₂ występują zarówno w wodzie wolnej, jak i w wodzie związanej a przytem są wiązane przez koloid. Dwa ostatnie punkty tyczą się tylko rozmieszczenia soli w rozcieńczonym żółtku kurzem.

Piśmiennictwo.

- Asheshov I. N. 1925. Préparations des membranes en collodion graduées. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **77** (362). Augsberger A. 1925. Ultrafiltration und Kompensationsdialyse. Ein Beitrag zur Frage der Ionenbindung im Blutserum. *Erg. d. Physiol.* **24** (618). Berczeller L. 1918. Über negative Adsorption. *Bioch. Zeitschr.* **90** (290). Białaszewicz K. 1912. Über das Verhalten des osmotischen Druckes während der Entwicklung der Wirbeltierembryonen. *Arch. f. Entw. Mech.* **34** (489). Białaszewicz K. 1926. O składzie mineralnym komórek jajowych. *Trav. Inst. Nencki (Varsovie)*. **3**. № 52. Białaszewicz K. 1927. O zastosowaniu ultrafiltracji w badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w cytoplazmie. *Trav. Inst. Nencki (Varsovie)*. **4**. № 57. Białaszewicz K. 1928 a. Sur la composition minérale des cellules-oeufs. *Publicaz. della Stazione Zool. di Napoli*. **8 VIII** (355). Białaszewicz K. 1928 b. L'ultrafiltration appliquée aux recherches sur la répartition des électrolytes dans le cytoplasme. *Ann. de Physiologie*. **4**. VII (190). Białaszewicz K. 1928 c. Studja porównawcze nad składem cieczy międzycząstkowej komórek jajowych. (Etudes comparées sur la composition du liquide intermicellaire des oeufs). *Acta Biol. Experim.* **1**. N II. Białaszewicz K. 1929. Recherches sur la répartition des électrolytes dans le protoplasme des cellules ovulaire. *Protoplasma*. **6** (1). Bugarszky S. und L. Liebermann. 1898. Über das Bindungsvermögen eiweisartiger Körper für Salzsäure, Natriumhydroxyd und Kochsalz. *Arch. f. ges. Physiol.* **72** (51). Cohn E. J. 1925. The physical chemistry of the proteins. *Physiol. Rev.* **5** (348). Dekhuyzen. 1908. Ein Kryoskop. *Bioch. Zeitschr.* **11** (346). Ege R. 1922. Untersuchungen über die Volumenveränderungen der Blutkörperchen in Lösungen von verschiedenem osmotischen Druck. III Mitteilung. Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen. *Bioch. Zeitschr.* **130** (99). Eggerth A. H. 1921. The preparation and standardization of collodion membranes. *Journ. of biol. Chem.* **48** (203). Einstein A.

1906. *Ann. d. Physik.* **19** (289). (Cytow. wg. Kunitza, '26). **Einstein A.** 1911. *Ann. Physik.* **34** (591). (Cytow. wg. Kunitza, '26). **Fredericq L.** 1902. Sur la concentration moléculaire des solutions d'albumine et de sels. *Acad. Roy. de Belgique. Bull. de la Classe des Sc.* **7** (437). *Arch. Biol.* **20** (731). **Fredericq L.** 1904. Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. *Arch. de Biol.* **20** (709). **Hamburger H. J.** 1902. *Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften.* Wiesbaden. **Hatscheck E.** 1910. *Z. Chem. u. Ind. Kolloide.* **7** (301). (Cytow. wg. Kunitza '26). **Kunitz M.** 1926. An empirical formula for the relation between viscosity of solution and volume of solute. *Journ. of gen. Physiol.* **9** (715). **Loeb J.** 1922. *Proteins and the theory of colloidal behavior.* New-York. **Looney J. M.** 1922. The preparation of flexible collodion membranes. *Journ. of biol. Chem.* **50** (1). **Netter H.** 1927. Über den nichtlösenden Raum (sog. disperse Phase) und seine Bedeutung für zellphysiologische Probleme. *Protoplasma.* **2** (554). **Northrop J. H. and M. Kunitz.** 1925. The combination of salts and proteins. I. *Journ. of gen. Physiol.* **7** (25). **Northrop J. H. and M. Kunitz.** 1926. The combination of salts and proteins. II. *Journ. of gen. Physiol.* **9** (351). **Pauli Wo.** 1920. *Kolloidchemie der Eiweisskörper.* Wien-Liepzig. **Pauli Wo.** 1926. *Eiweisskörper und Säuren.* *Koll. Zeitschr.* **40** (185). **Polányi M.** 1920. Studien über Leitfähigkeitserniedrigung und Adsorption durch lyophile Kolloide. *Bioch. Zeitschr.* **104** (237). **Rona P.** 1910. Über das Verhalten des Chlors im Serum. *Bioch. Zeitschr.* **27** (501). **Whiteharn J. C.** 1921. A system of blood analysis. Simplified method for the determination of chlorides in blood plasma. *Journ. of biol. Chem.* **45** (449).

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

[Zakład Biologii Ogólnej Instytutu im. Nenckiego].

Zygmunt Czerniewski.

Spirostomum ambiguum Ehrbg. Studja biologiczne.

Cz. I: Hodowle w odwarze siana. Ruch wodniczków pokarmowych, utworzonych w zawiesinach karminu i żółtka. Mechanizm skurczu.

Spirostomum ambiguum Ehrbg. *Biologische Studien. I. Zucht in Heuaufguss. Bewegung der Nahrungsvakuolen, welche die Karmin- und Eidotterteilchen enthalten. Kontraktionsmechanismus.*

Rękopis nadesłany w dniu 24. X. 1929 r.

1°. Im Widerspruch zu der hie und da vertretenen, entgegengesetzten Meinung, lässt sich *Spirostomum* wohl in Heuaufgüssen züchten. Der vom Verfasser zu solchen Zuchten gebrauchte Heuaufguss (6 — 10 g. Heu auf 1 L. Wasser: vor jedem Gebrauche mit Wasser zu verdünnen) wurde zunächst, mehrere Tage hindurch in zugedeckten Glasgefässen isoliert gelassen. Es ist sehr zweckmässig, den sich darin etwickelnden, gasförmigen Verbindungen einen Ausführungsgang zu versichern. Zu dem Zwecke rollt man ein Stück Papier zusammen und legt es zwischen den Gefässrand und den Deckel ein. Nicht minder günstig wirkt — in demselben Sinne — auch die Anwesenheit der von Heu herkommenden Grasteilchen auf dem Boden des Gefässes ein.

In die so bereiteten Milieux brachte man nun *Spirostomen* hinein und erhielt bald darauf gut entwickelte Kulturen. Wenige Stunden nach jedem nachträglich erneuten Zusatze des Heuaufgusses (zu den erhaltenen Kulturen), pflegen die *Spirostomen* sich in der obersten Schicht der Kultur in dicht gedrängten Mengen zu sammeln. Nach einiger Zeit sinken sie allmählich nieder — so, dass sie nunmehr in dem ganzen, für sie zugänglichen Raume, herumtaumeln. In diesem Zustande verbleibt die Kultur, gewöhnlich, ziemlich lange: nachher fangen einzelne Indivi-

duen an, zu Boden zu sinken, und — nach einigen Tagen — kann man den Tieren nur ausnahmsweise oberhalb des Gefäßbodens begegnen.

2°. Die Nahrungsvakuolen, welche Karmin- und Eidotterteilchen enthalten, bewegen sich, wie die gewöhnlichen Nahrungsvakuolen, und gelangen bis an das vordere Ende des Tieres.

3°. Was die von STEIN ('67) aufgestellte Anschauung über den Kontraktionsmechanismus bei *Spirostomum* anbetrifft, so sollte man dieselbe als unrichtig betrachten, und zwar aus folgenden Gründen: vor allem, lässt sie sich weder als deutlich, noch als eindeutig formuliert betrachten (man vergleiche entsprechende Stellen aus der Arbeit von STEIN ('67) selbst auf S. 27—30 mit den anderen, welche der Verfasser in seiner Arbeit aus STEIN zitiert).

Selbst unabhängig von der Auseinandersetzungsweise der Begriffe von der Natur des Streifens (Fibrille) und der Kontraktion kann die in Rede stehende Anschauung nicht als richtig anerkannt werden. Nehmen wir, zuerst, an, dass die Fibrillen bei *Spirostomum* sich in derselben Weise kontrahieren sollten, wie die Muskelfaser im Stiele der *Vorticelliden*, und die Streifen bei verschiedenen Infusorien von gleicher Beschaffenheit wären, wie es STEIN annimmt, — wie könnte man dann, sich die grosse Differenz zwischen den Kontraktionsarten bei *Stentor*, einerseits, und bei *Spirostomum*, andererseits, erklären? Und wie könnte man, ferner, den Prozess der Kontraktion mit Hilfe der Annahme STEIN's erklären, wonach nicht alle Streifen, bzg. nicht alle Streifen gleichförmig, sich in ihrer ganzen Länge kontrahieren sollten?

Nehmen wir, zweitens an — die Fibrillen kontrahieren sich, wie die gewöhnlichen Muskelfibrillen, — so müsste als natürliche Folge der Fibrillenkontraktion die Annäherung ihrer beiden Endigungen zustandekommen: somit würde die Fibrillenkontraktion eine Körperverkürzung nebst einer schwachen Rotation um die Körperachse zur Folge haben, nur in einer anderen Richtung als die in der Wirklichkeit zu Tage auftretende.

4°. Die Untersuchungen des Verfassers erweisen, dass die *Spirostomen* — nach der Beendigung der Kontraktion — sich zunächst in einer geraden Richtung ausdehnen und, nachdem diese Ausdehnung ca. 50% der Länge des Tieres in kontrahiertem Zustande erreicht hatte, fängt die Rotation des Tieres an.

Der hypothetische Kontraktionsmechanismus mag bei *Spirostomum* aus zwei Systemen der kontraktilen Fibrillen bestehen: dies wären: a) — die Längsfibrillen, welche in der Richtung der Körperstreifen verlaufen, und b) — die Spiralfibrillen, bei deren Kontraktion die Umdrehung des Körpers zustandekommt. Den eigentlichen Verlauf des Ausdehnungsprozesses könnte man als Folge der Verzögerung des Erschlaffens der Spiralfibrillen betrachten.

I. Hodowle w odwarze siana.

Próby hodowli *Spirostomum* w odwarze siana zostały dokonane po raz pierwszy, o ile mi wiadomo, przez BISHOP ('23). Po wstępnych niepowodzeniach, które zapewne należy tłumaczyć użyciem zbyt świeżych odwarów, autorka zaprzestała dalszych prób w tym kierunku. Następną wzmiankę spotykamy u BLÄTTNERA ('26). W sprawie nas obchodzącej autor ten wyowiada się wyraźnie: „Die Aufzucht in Heufusionen ist unmöglich“. (str. 260).

Materiał, używany przeze mnie do hodowli i doświadczeń, — *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. var. *maior* — pochodzi z Drewnicy pod Warszawą, ze stawków torfowych. W wodzie przyniesionej z wycieczki (wrzesień 1925 r.) nie znalazłem ani jednego osobnika *Spirostomum* — były one zapewne ukryte na dnie akwarjum wśród butwiejących cząstek i zaczęły się ukazywać dopiero po paru tygodniach, gdy się rozpoczął intensywny proces rozpadu nagromadzonych w akwarjum resztek organicznych.

Z chwilą ukazania się większej ilości osobników *Spirostomum* rozpocząłem próby hodowli w odwarze siana, zawierającym bakterje.

Odwar otrzymywałem, gotując 5 — 8 g siana w 1 l wody i rozcieńczając przed użyciem kilkoma objętościami wody zwyczajnej. W celu przyspieszenia rozwoju bakteryj — zimną, w stosunkowo niskiej temperaturze pracowni — staje się to niemal koniecznością — pozostawiałem kolbę po ostygnięciu odwaru na kilka wzgl. kilkanaście godzin bez przykrycia. Naczynia, używane do hodowli, należały do różnych typów, najczęściej były to szklane słoje około 2 l pojemności bez przewężenia u góry.

Początkowo naczynia, zawierające hodowle *Spirostomum*, przykrywałem szklanymi płytkami, nie stosując szczególnych środków ostrożności. W tych warunkach próby użycia odwaru siana niezawierającego bakteryj nie powiodły się — odwar świeżo przygotowany działał tak silnie, że

Spirostoma gńeły w nim już po kilku godzinach, przedłużając swoją egzystencję w najlepszym przypadku do jednej doby; w odwarze zaś, przygotowanym na kilka dni przed użyciem, ale nie zawierającym bakteryj, *Spirostoma* pozostawały wprawdzie przy życiu, lecz ich ruchy zwolnione oraz opadanie na dno i pozostawanie tam przynajmniej w ciągu kilkunastu godzin wskazywały na nieodpowiednie właściwości takiego odwaru, jako środowiska dla *Spirostomum*.

W odwarze siana, zawierającym bakterje, hodowle rozwijały się naogół dobrze. Nieliczne jednak wypadki wyginięcia hodowli z powodu nagromadzenia się większych ilości szkodliwych substancyj zmusiły mnie do zmodyfikowania warunków hodowli. Modyfikacja polegała na tem, że na brzegu naczynia pod przykrywką umieszczałem wałeczek ze zwiniętego papieru, pozostawiając w ten sposób szparę, przez którą mogły uchodzić lotne substancje. W tych warunkach hodowle rozwijają się bardzo dobrze¹⁾, a w nielicznych przypadkach otrzymałem dodatnie wyniki nawet przy użyciu świeżo przygotowanego odwaru siana.

Zachowanie się *Spirostomum* w tak prowadzonych hodowlach jest dość stereotypowe. W kilka godzin po dodaniu odwaru siana *Spirostomum*, leżące dotąd na dnie naczynia pomiędzy kawałkami łożyszek i listków²⁾, zaczynają równomiernie wypełniać całą dostępną im przestrzeń. Zazwyczaj już w następnym dniu gromadzą się u góry, tworząc gęste skupienia, poczem w ciągu następnych dni skupienia te zaczynają się stopniowo opuszczać, jednocześnie się rozpraszając, tak iż po 1—2 tygodniach wszystkie niemal osobniki zostają zgromadzone wśród butwiejących cząstek na dnie naczynia.

Odchylenia od wyżej naszkicowanego typowego obrazu bywają następujące: 1) równomierne rozmieszczenie *Spirostomum* w całej masie odwaru utrzymuje się przez czas dłuższy; 2) niekiedy można obserwować parokrotne wznoszenie się i opadanie *Spirostomum*, połączone nieraz z tworzeniem się u góry wyraźnej warstwy, powstającej skutkiem nagromadzenia się *Spirostomum* na tym poziomie; 3) czasem tworzą się lokalne skupienia — zajmują one zwykle jedną stronę naczynia, niekiedy są ułożone ukośnie i występują nawet w środowisku przezroczystym, zawierającym w najlepszym przypadku minimalne ilości bakteryj wtedy gdy większość osobników żeruje już na dnie naczynia. Prócz tego dość często, zwłaszcza w naczyniach, zawierających od dłuższego czasu hodowle, rozwijają się nadzwyczaj gęste skupienia na dolnej powierzchni błonki bakteryjnej, pokrywającej hodowlę, oraz w różnych miejscach hodowli dokoła unoszących się w cieczy drobnych cząstek.

Równolegle do zmian w rozmieszczeniu *Spirostomum* zachodzą zmiany w środowisku. Po dodaniu nowej porcji odwaru środowisko to staje się

¹⁾ Pojęcie o stanie hodowli dają obliczenia, wykazujące przeciętnie 20 i więcej osobników w 1 cm³ w miejscach, gdzie nie było gęstych skupień.

²⁾ Z licznych spostrzeżeń wyniosłem wrażenie, że obecność butwiejących resztek roślinnych wywiera dodatni wpływ na rozwój *Spirostomum*.

mętne skutkiem obecności znacznych ilości bakteryj oraz drobnych cząstek siana — *Spirostoma* gromadzą się wówczas u góry. Taki stan rzeczy trwa zwykle 2—3 dni. W tym czasie środowisko staje się mniej mętne skutkiem zmniejszenia się ilości bakteryj (cząstki siana opadają już w ciągu pierwszej doby, a u góry tuż pod powierzchnią może się utworzyć warstwa zupełnie przezroczysta paru centymetrów grubości). W tym okresie *Spirostoma* zaczynają zwykle wypełniać sobą całą wolną przestrzeń dostępną dla nich części naczynia z wyjątkiem tej właśnie przezroczystej warstwy u góry. Proces ten postępuje w dalszym ciągu ku dołowi tak, że po kilku wzgl. kilkunastu dniach środowisko w całej masie staje się przezroczyste, zachowując ten wygląd i nadal. Jeżeli w tym czasie dodać trochę odwaru siana, rozpoczynają się ponownie zmiany wyżej opisane z tą jednak różnicą, że poszczególne okresy trwają w tym przypadku krócej, odpowiednio do małej ilości dodanego odwaru.

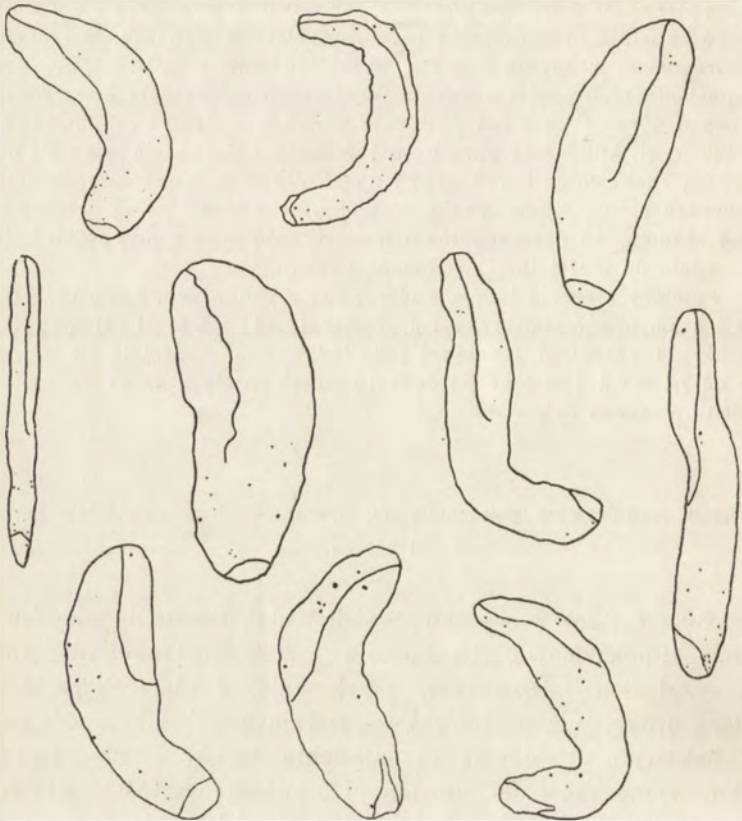
Pomiary stężenia jonów wodorowych w hodowlach, dokonane przeze mnie już po ukończeniu rękopisu, wykazały, że wartości pH, otrzymane przy użyciu czerwieni fenolowej jako indykatora, zmieniają się w granicach od 7.1—7.6 (wkrótce po dodaniu nowej porcji odwaru) do 7.8—8.2 (koniec opisanego cyklu).

II. Ruch wodniczków pokarmowych, utworzonych w zawieszinie karminu i żółtka.

BISHOP ('23) w wyniku swoich badań doszła do wniosku, że wodniczki pokarmowe, utworzone z cząstek substancyj, obojętnych pod względem odżywczym, przebywają w ciele *Spirostomum* krótszą drogą, niż wodniczki, zawierające substancje odżywcze (np. bakterje). Ponieważ przeniesienie zasady odmiennego stosunku wymoczków do substancyj o różnej wartości odżywczej w czasie ich pobierania na dziedzinę zjawisk, związanych z trawieniem pobranych substancyj, nie narzucało mi się z koniecznością, ani wydawało się celowym ze względów metodologicznych; ponieważ, dalej, i moje przygodne spostrzeżenia przeczyły wynikom, otrzymanym przez autorkę, uważałem za wskazane podjęcie odnośnych badań.

Metodyka i technika wykonywania doświadczeń.
1^o. Przed wykonaniem doświadczenia *Spirostoma*, kilkakrotnie przemyte, przenosiłem na 1 dobę do czystej wody w celu usunięcia uprzednio utworzonych wodniczków pokarmowych, poczem jedną połowę osobników umieszczałem w zawieszinie karminu wzgl. żółtka, drugą zaś przenosiłem do odwaru siana, zawierającego bakterje (kontrola!). 2^o. W doświadczeniach, ro-

bionych metodą autorki ¹⁾, przynosiłem osobniki, przeznaczone do badań, z odwaru siana (bez uprzedniego głodzenia) do zawiesziny karminu w odwarze siana (nie w wodzie). 3°. Zawiesinę przygotowywałem, rozcierając z wodą



Rys. 1. *Spirostomum ambiguum*. Rozmieszczenie wodniczków pokarmowych, utworzonych w zawiesinach żółtka (dolny rząd) i karminu (pozostałe). Peristom oraz wodniczek kurczliwy przedstawiono schematycznie, zarys ciała i rozmieszczenie wodniczków pokarmowych dokładnie według preparatów. Powiększenie około 100 razy.

Fig. 1. *Spirostomum ambiguum*. Die Verteilung der Nahrungsvakuolen, welche die Karmin und Eidotterteilchen enthalten (obere und mittlere Reihe — Karmin, untere — Eidotterteilchen). Das Peristomfeld und die kontraktile Vakuole sind schematisch dargestellt; dagegen der Körperrunriss und die Verteilung der Nahrungsvakuolen sind nach den Präparaten genau aufgezeichnet. Vergr. ca 100-mal.

¹⁾ W doświadczeniach tych, pozbawionych, zresztą, wartości metodologicznej w zastosowaniu do rozwiązania głównego zagadnienia, chodziło mi o stosunek cząstek karminu do bakterij w wodniczках, w tych warunkach utworzonych.

karmin wzgl. żółtko ugotowanego jaja. Tak przygotowaną zawiesinę używałem po paru godzinach, zdejmując zapomocą pipety górną warstwę niezawierającą większych cząstek. 4°. Badania mikroskopowe (imersja $1/12$) wodniczków, utworzonych w zawiesinie karminu wzgl. żółtka, nie wykazały obecności drobniotkłych ziarenek, charakterystycznych dla wodniczków pokarmowych, utworzonych w odwarze siana, zawierającym bakterje. Przyjmuję na tej podstawie, że wodniczki, utworzone w zawiesinie karminu wzgl. żółtka, bakteryj nie zawierały. 5°. W każdym doświadczeniu starałem się uwzględnić wszystkie osobniki.

W tych warunkach (met. 1) *Spirostoma* już po upływie paru godzin tworzą wodniczki, zawierające tylko cząstki karminu, wzgl. żółtka. Ilość i rozmieszczenie tych wodniczków waha się w szerokich granicach tak, iż obok osobników, zawierających dużo wodniczków, są i takie, które ich nie posiadają. We wszystkich wszakże przypadkach, w których wodniczki zostały utworzone, mogłem stwierdzić, iż posuwają się one i dochodzą ku przodowi tak daleko, jak wodniczki, utworzone w odwarze siana (p. rys. 1).

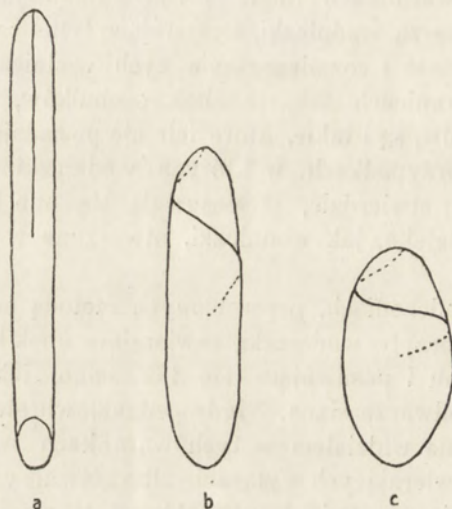
W doświadczeniach, przerobionych metodą autorki (met. 2), *Spirostoma* tworzyły wodniczki, zawierające obok bakteryj trochę cząstek karminu i posuwające się tak samo, jak i wodniczki, utworzone w odwarze siana. Nigdy jednak, wbrew temu, co podaje autorka, nie widziałem w tych warunkach wodniczków pokarmowych, zawierających wyłącznie albo głównie cząstki karminu.

Poprzestaję na stwierdzeniu różnicy w wynikach doświadczeń, wykonanych przy użyciu tej samej metody (met. 2), nie wdając się w analizę przyczyn tej różnicy wobec braku w pracy autorki szczegółowych danych, dotyczących metodyki wykonywania doświadczeń (brak wzmianki np. o tem, czy i w jaki sposób były wykonane doświadczenia kontrolne).

III. Mechanizm skurczu.

Spirostomum swoiście reaguje na podniety o odpowiedniem natężeniu: ciało wymoczcza skraca się, skręcając się jednocześnie dokoła swojej osi podłużnej, trwa w tym stanie zazwyczaj krótką chwilę, poczem rozkurcza się, jeżeli ustaje działanie podniety, skurcz wywołującej. Podniety trwałe wywołują szereg szybko po sobie następujących skurczów, które się zlewają w jeden długotrwały skurcz. Zjawisko skurczu w każdym przypadku przebiega

ze znaczną szybkością, zależną w pewnym stopniu od natężenia podniecy. Rys. 2 przedstawia schematycznie *Spirostomum* w trzech stadiach. Linja, wyobrażająca peristom, daje pojęcie o stopniu skręcenia, które dla całego organizmu wynosi 2 obroty¹⁾. Ektoplazma *Spirostomum* posiada szereg wąskich podłużnych pasek, z którymi zgodnie przebiegają nieco głębiej położone włókienka (od przodu i z lewej strony ku tyłowi i na prawo ze stanowiska obserwatora).



Rys. 2. *Spirostomum ambiguum* w stanie a) rozkurczu, b) słabego skurczu, c) silnego skurczu. (Schemat).

Fig. 2. Schematische Darstellung von *Spirostomum ambiguum*: a) in der Ausdehnung, b) mässig kontrahiert, c) stark kontrahiert.

Krytyczny przegląd piśmiennictwa. Zjawisko skurczu wymoczków zostało przez STEINA ('67) uzależnione od kurczenia się włókienek²⁾.

Poglądy tego autora na zjawiska, związane z procesem skurczu *Spirostomum*, dadzą się przedstawić w postaci następujących twierdzeń:

¹⁾ Zwracam uwagę na to, że przebieg peristomu *Spirostomum* w stanie skurczu został przedstawiony przez DOFLEINA ('27, rys. 142) błędnie — peristom w czasie skurczu zawsze ulega skręceniu.

²⁾ Mimo, że WERNECK wcześniej od STEINA wypowiedział podobny pogląd na rolę włókienek w kurczeniu się wymoczków, za właściwego twórcę tego poglądu należy jednak uznać STEINA, który w celu uzasadnienia swego poglądu zebrał i opracował bogaty materiał.

1. Pasemka (Körperstreifen) odpowiadają włóknom mięśniowym (l. c., str. 29, 30, 202).

2. W organizmie nieskurezonym pasemka przebiegają, tworząc około $2\frac{1}{2}$ obrotów ¹⁾ (str. 27 — 28).

3. Skurez *Spirostomum* jest połączony ze skręceniem się ciała dookoła osi zwierzęcia i odbywa się w kierunku przebiegu pasemek (str. 29, 189, 202).

4. Każde pasemko zachowuje się tak, jak mięsień w łodyżce *Vorticellidae* (str. 29).

5. Skurez *Spirostomum* jest wynikiem tego, że kurczą się nie wszystkie pasemka, wzgl. nie w całym swoim przebiegu jednakowo (str. 202).

Twierdzenia te nasuwają kilka uwag.

Punkt 3. w odniesieniu do *Spirostomum* nie odtwarza istotnego stanu rzeczy. Nigdy bowiem dzięki spiralnemu przebiegowi włókienek ²⁾ oraz złożonemu ruchowi, skurez zwierzęcia nie przebiega ściśle w kierunku włókienek. Jeżeli zaś zadowolić się najogólniej pojętą zgodnością obu kierunków, wówczas twierdzenie to staje się tak wieloznaczne, że zatracą wszelką wartość.

Treść twierdzenia 4. została wypowiedziana przez STEINA aż nadto wyraźnie, natomiast twierdzenie 1. może nasunąć pewne wątpliwości o tyle, że pojęcie „entsprechen“ i jemu pokrewne mogą nie oznaczać identity w przebiegu skurezu. Opierając się na tem, co mówi STEIN o elementach kurczliwych i ich funkcji u wymoczków, należałoby uznać, że włókienka kurczą się jak zwykle włókna mięśniowe *Metazoa*, co zresztą pośrednio wynika z ich struktury. A w tym przypadku twierdzenia 1. i 4. wyłączają się wzajemnie.

Pogląd STEINA został przyjęty przez późniejszych autorów bez podania go krytyce, mimo iż nie był sformułowany jednoznacznie, o czem dosadnie przekonywa zestawienie odnośnych miejsc ³⁾.

¹⁾ Według BUTSCHLI'ego ('87 — '89) ilość obrotów wynosi tylko 1. Wielkość ta zdaje się odpowiada rzeczywistym stosunkom, przynajmniej u *var. maior*.

²⁾ STEIN używał wyrazu „pasemka“ w znaczeniu włókienek.

³⁾ „Die Contraktionen erfolgen in der Richtung der Körperstreifen, bald nur an bestimmten Gruppen oder an partiellen Strecken derselben, bald an allen zugleich und ihrer ganzen Länge nach. Im ersteren Falle nimmt der Körper eine geschlängelt-schraubenförmige Gestalt an oder er dreht sich mit der vordern Hälfte spiralförmig nach rechts oder nach links; im letztern Falle schnell er plötzlich, indem er sich gleichzeitig schraubenförmig um seine Axe windet, der Länge nach mit grosser Energie zusammen“ (STEIN '67, str. 189). „Hieraus ergibt sich, dass die schraubenförmige Drehung und das Zusammenschnellen des Körpers dadurch erfolgt, dass sich die Körperstreifen nicht gleichzeitig und gleichmässig verkürzen, sondern dass ein gewisser Complex von Streifen, wie der, welcher dem mittleren Feld in Fig. 3. entspricht, sich früher und stärker contrahirt, als die übrigen Streifen, und dass die Streifen eines Complexes sich wider nur streckenweise in grösseren Längsabschnitten contrahiren“ (STEIN '67, str. 202).

Niemniej trudno uznać ten pogląd za należyte uzasadniony, STEIN bowiem ani razu nie wspomina o charakterze związku, zachodzącego pomiędzy kurczeniem się włókienek a bardzo złożonym ruchem, jaki zachodzi w czasie skurczu zwierzęcia. A przecież związek ten nie jest aż tak oczywisty, iżby można było uznać pogląd STEINA za uzasadniony bez szczegółowego wyjaśnienia mechanizmu tego zjawiska.

Pogląd ten wreszcie nie może być uznany za słuszny i to niezależnie od interpretacji pojęcia skurczu włókienek. Przypuśćmy narazie, że włókienka się kurczą podobnie, jak mięsień w łodyżce *Vorticellidae*. Jeżeli, jak to zaznacza STEIN, włókienka rozmaitych wymoczków posiadają jednaki cechy istotne (Wesenheit), to jak wytłumaczyć bądź co bądź znaczną różnicę w przebiegu skurczu *Stentora* a *Spirostomum*? Prócz tego, czy w tym przypadku konieczne jest do wywołania skurczu zwierzęcia, ażeby się kurczyły nie wszystkie włókienka, wzgl. nie w całym swoim przebiegu jednakowo, o czym STEIN mówi niżej wyraźniej, podając to właśnie, jako istotną przyczynę skurczu? Trudności są oczywiste i zbyt poważne, aby je ominąć i uznać pogląd STEINA w tej interpretacji za słuszny.

Weźmy pod rozwagę drugą możliwość: włókienka się kurczą jak zwykle włókna mięsne. Wówczas bez względu na to, czy kurczą się wszystkie włókienka, czy tylko pewna ich część, wzgl. czy to zjawisko zachodzi na całej długości włókienek, czy też dotyczy pewnych tylko odcinków, zawsze wynikiem skurczu włókienka jest zbliżenie się ku sobie jego końców, a w przypadku *Spirostomum* — spiralny przebieg włókienek i możność skręcenia ciała dokoła osi — rozkręcenie spirali i, eo ipso, lekkie skręcenie ciała zwierzęcia dokoła jego osi, ale w kierunku odwrotnym do obserwowanego przy skurczu. Czyli pogląd STEINA i w tej interpretacji nie może być uznany za słuszny.

Po tej niezbędnej dygresji wracam do historii zagadnienia.

Dłuższa przerwa poprzedza ukazanie się pracy MAIERA ('03). Stosując metody utrwalania i barwienia, wykazał ten autor w komórce *Spirostomum*: a) układ włókienek, przebiegających w kierunku pasemek i tuż od niemi położonych, b) dwa grubsze włókna („zonale Myoneme“), leżące wzdłuż peristomu po jednym z każdej strony, oraz c) dużo krótkich włókienek, leżących na obwodzie tuż pod pellikulą i przebiegających okrężnie na przestrzeni niewielkiej części obwodu. Trzy te rodzaje włókienek uznaje autor za włókienka kurczliwe, wyobrażając sobie ich rolę w mechanizmie skurczu w sposób nader zawily ¹⁾.

¹⁾ „Vielleicht bewirken diese „zonalen“ Myoneme, wie wir sie nennen wollen, die wiederholt beobachtete Torsion des *Spirostomum* von der STEIN annahm, dass sie darauf beruhe, dass sich nicht die Myoneme aller Körperstreifen gleichzeitig kontrahieren, wie bei normaler Zusammenziehung, sondern nur eine Anzahl benachbarter. Bei solchen Spirostomeen erfolgt also die Kontraktion längs eines den Körper schraubig umziehenden Bandes nach Art des Vorticellenstieles. Die Wirkung eines solchen Bandes ist vielleicht auf die beiden starken zonalen Myoneme zurückzuführen“ (MAIER '03, str. 110).

Przytaczam ten ustęp w całości jako dosadną charakterystykę stosowanych podówczas metod „tłumaczenia“ badanych zjawisk.

Nieco później ukazała się praca PÜTTERA ('04 a), poświęcona zresztą innym zagadnieniom, w której autor stwierdził niezależność czynnościową włókienek podłużnych i włókien zonalnych. Nadto uznał, że włókienka okrężne są czynne w czasie rozkurczu oraz, że przy skurczu zwierzęcia wszystkie podłużne włókienka kurezą się jednakowo.

Na tem kończę przegląd piśmiennictwa, ponieważ inne prace, dotyczące *Spirostomum*, do ostatnich włącznie nie zawierają nic nowego z dziedziny interesującego nas zagadnienia.

Krytyczne rozpatrzenie poglądu STEINA i jego ewolucji nasuwa następujące uwagi.

Ewolucja i stan obecny zagadnienia skurczu *Spirostomum* nie odpowiadają postępowi, dokonany w pokrewnych dziedzinach biologji.

Pogląd STEINA ('67) na rolę włókienek w skurczu *Spirostomum* nie może być uznany za słuszny. Mógłby jednak zostać uzgodniony z ogólnie znanym przebiegiem skurczu w postaci twierdzenia 4. po odrzuceniu dodatkowych założeń i hipotez ¹⁾.

Badania własne. Pomijając ogólny opis zjawiska skurczu, jako dobrze znany, poprzestaję na podkreśleniu kilku punktów.

1°. Ruch spiralny nie ogranicza się do części powierzchniowych, ale ogarnia i głębiej położone jądro, kanał wodniczka kurezliwego, wodniczki pokarmowe i t. d.

2°. Przy rozważaniu zmian, zachodzących w czasie skurczu, dowolnie obrany przekrój wzgl. jeden z końców ciała może być warunkowo przyjęty za pozostający w spoczynku. Szybkość linjowa i droga, dowolnie obranej cząstki są funkcjami odległości od tego przekroju (do końców ciała) oraz od osi zwierzęcia (ku obwodowi).

3°. Ruch cząstek ciała zachodzi tak, jakgdyby był wypadkową 2 ruchów: wzdłuż osi ciała (dośrodkowo) i obrotowego. Całkowite skrócenie wynosi około 2 obrotów.

4°. Cząstki, leżące w tej części zwierzęcia, którą można uważać za walec, poruszają się po krzywych, opasujących powierzchnię walca i nachylonych do osi zwierzęcia pod kątem około 45°. Na powierzchni rozwiniętej krzywym tym odpowiadają proste, tak samo nachylone do osi. Cząstki, leżące na końcach ciała, którego powierzchnia w tych miejscach znacznie się różni od powierzchni walca, poruszają się inaczej.

¹⁾ O niezgodności poglądu STEINA z przebiegiem rozkurczu p. niżej.

Zjawisko rozkurczu, niemal pomijane w opisach autorów, nie jest li-tylko odwróceniem poprzedniego zjawiska, ale posiada swoisty przebieg.

Jeżeli umieścić *Spirostoma* na szkiełku w kropli wody wzgl. pożywki i przykryć szkiełkiem pokrywkowem, ograniczając w ten sposób swobodę ich ruchów ¹⁾, wówczas można łatwo stwierdzić, że wskutek mechanicznej podniety, jaką może być np. lekkie uderzanie stolika mikroskopu, następuje raptowny skurcz zwierzęcia, a w chwilę później, gdy ustanie działanie podniety, powrót do stanu rozkurczu. Otóż w okresie rozkurczu we wszystkich przypadkach, kiedy analiza ruchów była możliwa, mogłem stwierdzić, że powrót do stanu rozkurczu zaczyna się od wydłużania ciała i że dopiero później, po stosunkowo znacznem wydłużeniu, *Spirostomum* zaczyna się rozkręcać i wraca do stanu zupełnego rozkurczu. Dwie te fazy dają się łatwo zaobserwować dzięki temu, że zazwyczaj ciemno zabarwiony brzeg peristomu jest dobrze widoczny.

Niemniej łatwo można zaobserwować dwufazowość rozkurczu i w tych przypadkach, gdy *Spirostoma* zostaną umieszczone w drobnej zawieszynie karminu Grüblera. Pod wpływem słabych bodźców, jakimi są drobne cząstki karminu, występują dość często skurcze, przyczem w okresie rozkurczu ruch obrotowy zwierząt niekiedy ustaje i dzięki temu można łatwo zaobserwować niezależność ruchów wydłużania się i rozkręcania. Spostrzeżenia, w tych warunkach dokonane, usuwają — rzecz jasna — zarzuty, jakie możnaby podnieść w wypadku stosowania wyłącznie pierwszej metody (zmiany w organizmie *Spirostomum*, wywołane uciskiem szkiełka pokrywkowego).

Okoliczność, że ruchy te, niejednocześnie występujące, nie zostały od siebie oddzielone przez żadnego z badaczy, wynika zapewne stąd, że w okresie rozkurczu *Spirostoma*, obracając się dość szybko dokoła osi — najczęściej na prawo ze stanowiska obserwatora, — wywołują złudzenie jednolitego ruchu tak dalece, że robiąc spostrzeżenia w zwykłych warunkach nie mogłem odróżnić obu jego składników, mimo że wielokrotnie stwierdzałem oddzielne ich występowanie w warunkach doświadczenia.

¹⁾ Daje się to łatwo wykonać, opierając szkiełko pokrywkowe na nóżkach z wosku lub z mieszaniny parafiny z wazeliną. Lekko naciskając szkiełko, można osiągnąć żądany stopień unieruchomienia.

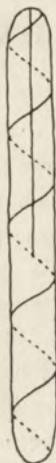
Hipotetyczny mechanizm skurczu. Z dwufazowości rozkurczu wynika istnienie w ciele *Spirostomum* dwufazowego mechanizmu¹⁾. Mechanizm ten może być czynny a) tylko w czasie skurczu, b) w rozkurczu, c) zarówno w skurczu jak i w rozkurczu. Jakkolwiek obecny stan badań w tej dziedzinie nie pozwala na dokonanie zdecydowanego wyboru, będąc w dalszym ciągu omawiał tę sprawę ze stanowiska pierwszej możliwości: mechanizm dwufazowy jest czynny tylko w czasie skurczu. Skłania mnie do tego okoliczność, że w zjawisku rozkurczu czynne są w pierwszym rzędzie siły, powstające przy odkształceniach w czasie skurczu, a więc nie działające dwukierunkowo (wydłużenie i rozkręcenie), wobec czego istnienie dwufazowego mechanizmu, czynnego w czasie rozkurczu, nie wydaje się prawdopodobne. Niemniej przemawia za tem i stosunkowo powolny przebieg skurczu.

Dwufazowy mechanizm, którego fazy zlewają się w szybkim skurczu, a mogą być oddzielone w okresie rozkurczu, może się składać z 2 układów włókienek kurczliwych. Jeden z tych układów — to włókienka, przebiegające w kierunku przebiegu pasek. Powodowałyby one w czasie skurczu skracanie się zwierzęcia, połączone z lekkim skręceniem na prawo, wywołanem nieco ukośnym przebiegiem tych włókienek. Drugi układ byłby utworzony przez włókienka, przebiegające spiralnie²⁾. O ich przebiegu można wypowiedzieć pewne przypuszczenia, opierając się na faktach, zaobserwowanych w czasie skurczu. Przebiegałyby więc one pod pewnym kątem do włókienek podłużnych. Z zasady równoległoboku sił wynika, że kierunek wypadkowej zależy od względnej wielkości obu tych sił oraz od wielkości kąta, utworzonego przez ich kierunki. Przyjęcie układu włókienek spiralnych, przebiegających niemal prostopadle do podłużnych, doprowadza do następującej konsekwencji: przy takim układzie sił ich

¹⁾ Z powyższego wynika konieczność odrzucenia poglądów, opartych li-tylko na istnieniu układów jednofazowych.

²⁾ Włókienka okrężne mogłyby w czasie skurczu skrócić *Spirostomum* tylko wtedy, gdyby ich części końcowe lub początkowe były ustalone na jakiejś krzywej, przebiegającej spiralnie. Takiej zaś krzywej u *Spirostomum* nie stwierdzono i jej istnienie wydaje się zgoła nieprawdopodobne. To samo dotyczy układów włókienek spiralnych o b. zbliżonych skrętach i kilku zaledwie obrotach.

wielkości musiałyby być niemal równe, skąd wobec wielkiej liczby zwojów, utworzonych przez układ spiralny, liczba obrotów organizmu w stanie skurczu wyniosłaby dużo więcej od obserwowanej. Prócz tego tak przebiegający układ hamowałby działanie układu podłużnego. Zakładając, że kąt pochylenia wynosi ok. 45° i rozumując analogicznie, dochodzimy do zupełnie odmiennej konsekwencji — zbyt małej liczby zwojów spiralnych oraz do znikomo małej ich siły kurczliwej, co znów zaprzecza faktom. Najbardziej prawdopodobne wydaje się przypuszczenie, że kąt pochylenia obu układów wynosi ok. 60° — 70° . Wówczas włókienka spiralne tworzyłyby kilka obrotów i przy współdziałaniu włókien podłużnych mogłyby powodować zmiany, obserwowane w czasie skurczu.



Rys. 3.
Spirostomum ambi-
guum. Hipotetyczny przebieg spiralnego włókienka (schemat).

Fig. 1.
Spirostomum ambi-
guum. Schematische Darstellung des hypothetischen Verlaufs einer Spiralfibrille.

Obydwu tym układom należy przypisać znaczny, zapewne jednakowy stopień pobudliwości, niejednakową natomiast szybkość powrotu do stanu rozkurczu po ustaniu działania podniety: włókienka podłużne już po krótkotrwałym skurczu przechodzą w stan rozkurczu, podczas gdy skurcz włókienek spiralnych trwa dłużej, tak że wskutek działania czynników rozkurczu organizm zdąży stosunkowo znacznie się wydłużyć, zanim ustanie skurcz włókienek spiralnych i organizm zacznie się rozkręcać. Dwufazowość rozkurczu byłaby więc wynikiem częściowego hamowania procesu przez włókienka spiralne.

Powyższa hipoteza tłumaczy zasadnicze fakty, obserwowane w czasie skurczu, oraz dwufazowość rozkurczu, i uzyskałaby wiele prawdopodobieństwa, gdyby się udało stwierdzić w ciele *Spirostomum* obecność obydwu układów włókienek.

Istnienie włókienek podłużnych nie nasuwa wątpliwości. Interpretacja włókienek okrężnych w sensie morfologicznych odpowiedników włókienek układu spiralnego zyskuje na prawdopodobieństwie, jeśli się zważy, że na przekrojach poprzecznych zwierzęcia włókienka spiralne, przebiegające pod kątem około 60° — 70° do włókienek podłużnych, mogą dać obrazy, odpowiadające obra-

zom włókienek okrężnych, dzięki temu, że w czasie skurczu zwoje spirali zbliżają się ku sobie, podczas gdy kąt wzajemnego pochylenia obu układów wzrasta.

Hipoteza dwufazowego mechanizmu skurczu zyskuje w ten sposób na prawdopodobieństwie, nie wystarczającym jednak, do uznania jej za należyte udowodnioną. Sądzę, że obecny stan badań w tej dziedzinie nie pozwala jeszcze na ostateczne rozwiązanie zagadnienia. Należy się spodziewać, że przyszłość rzuci więcej światła na tę sprawę, kierując ją, być może, na zasadniczo inne tory. Dalsze badania powinny pójść w kierunku pogłębienia naszej znajomości struktur, zawartych w komórce *Spirostomum*, oraz wszechstronnego poznania przebiegu zjawiska w zmiennych warunkach otoczenia i pod wpływem rozmaitych bodźców.

Streszczenie wyników.

Wbrew poglądom, wypowiedzianym przez niektórych autorów, *Spirostomum ambiguum* EHRBG. daje się łatwo hodować w odwarze siana, zawierającym bakterje.

Rozmieszczenie osobników w hodowlach ulega okresowym zmianom, odpowiednio do zmian, zachodzących w środowisku.

Wyniki doświadczeń z karminem i żółtkiem przemawiają za tem, że jakość pobranych substancyj nie wpływa na drogę, jaką wodniczki pokarmowe przebywają w ciele *Spirostomum*.

Wydaje się prawdopodobnym, że proces rozkurczu zachodzi wskutek działania sił, rozwijających się przy odkształceniach, które powstają w czasie skurczu.

Stwierdzono dwufazowość rozkurczu — wydłużanie się i rozkręcanie się *Spirostomum* zachodzą niejednocześnie.

Dwufazowość rozkurczu pociąga za sobą konieczność odrzucenia poglądów, tłumaczących zjawisko skurczu li-tylko za pomocą jednofazowego mechanizmu.

Strukturalne podłoże mechanizmu skurczu można wyobrazić jako zespół dwóch rodzajów włókienek kurczliwych — podłużnych i spiralnych — nachylonych ku sobie pod kątem około 60°. Dwufazowość rozkurczu byłaby wynikiem częściowego hamowania procesu przez włókienka spiralne. Obecny stan badań nie pozwala jednak na ostateczne rozwiązanie zagadnienia skurczu *Spirostomum*.

Piśmiennictwo.

- Bishop A.** 1923. Some observations upon *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Quart Journ. of Micr. Sc. **67** (391). **Bishop A.** 1927. The cytoplasmic structures of *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Quart. Journ. of Micr. Sc. **71** (147). **Blättner H.** 1926. Beiträge zur Reizphysiologie von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Arch. f. Protistenkunde. **53** (253). **Bütschli O.** 1887 — 1889. *Protozoa*. III. *Infusoria* und System der *Radiolaria*. Leipzig. **Calkins Gary N.** 1926. The biology of the *Protozoa*. Philad., New-York. **Doflein F.** 1927. Lehrbuch der Protozoenkunde. V Aufl. Jena. **Eyferth's B.** 1909 Einfachste Lebensformen des Tier- und Pflanzenreiches. IV Aufl. Braunschweig. **Maler H. N.** 1903. Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. Arch. f. Protistenkunde. **2** (73). **Neresheimer E. R.** 1903. Über die Höhe histologischer Differenzierung bei heterotrichen Ciliaten. Arch. f. Protistenkunde. **2** (305). **Pütter A.** 1904. Die Reizantwortungen der ciliaten Infusorien. Zeitschr. f. allg. Physiologie. **3** (40). **Saunders J. T.** 1924. The effect of the hydrogen ion concentration on the behaviour, growth and occurrence of *Spirostomum*. Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. **1** (189). **Stein F.** 1867. Der Organismus der Infusionsthiere. II Abt. Leipzig. **Wallengren H.** 1903. Zur Kenntnis der Galvanotaxis. Zeitschr. f. allg. Physiologie. **2** (516). **Wetzel A.** 1925. Vergleichend cytologische Untersuchungen an Ciliaten. Arch. f. Protistenkunde. **51** (209).

[Zakład Morfologii Doświadczalnej Instytutu im. Nenckiego]

Olga Krauze.

Przyczynek do poznania zachowania się dżdżownicy.

Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens des Regenwurmes.

Rękopis nadesłany w dniu 14. XII. 1929 r.

In der vorliegenden Arbeit werden die Faktoren, welche das Verhalten der Regenwürmer beim Einziehen verschiedener Gegenstände bestimmen, einer experimentellen Analyse unterworfen. Als Versuchsobjekt dienten grosse Exemplare von *Lumbricus terrestris*, die teils im Freien, teils in in einem Keller aufgestellten Holzkisten beobachtet wurden.

Es werden vier Teile der Blattspreite unterschieden, die auf der Fig. 1 mit Buchstaben bezeichnet worden sind. Dieselben Buchstaben bezeichnen in den Zahlentabellen die beim Einziehen von den Würmern bevorzugten Blattteile. Wie aus der Tab. I folgt, werden die Blätter von Esche, Akazie, Linde und Birke vorwiegend an der Spitze eingezogen, was mit den Ergebnissen früherer Untersucher übereinstimmt. Zwecks Analyse des chemischen Sinnes wurde der Versuch von HANEL in modifizierter Form wiederholt: blattähnliche Ausschnitte mit verkehrter Polarität (Fig. 3) wurden meistens an der neuen Basis eingezogen, was zugunsten einer Bevorzugung der Blattspitze auf Grund chemischer Unterschiede zu sprechen scheint. Jedoch sind in diesem Falle die Widerstandsverhältnisse unübersichtlich, indem der an der Blattbasis wesentlich stärkere Hauptnerv einen grösseren Widerstand bietet. Die Methode der mit zerriebenen und mit Gelatine vermischten Blattteilen bedeckten Holzstäbchen (MANGOLD) ergab, dass innerhalb der Blattspreite keine lokalen vom Regenwurm rezipierten Chemismen vorhanden sind. Die Blattspitze wird von der Blattbasis nicht unterschieden. Demgegenüber üben

alle Blatteile, mit reiner Gelatine verglichen, einen deutlich anziehenden Einfluss aus (Tab. IV).

Was die Form der Blätter anbelangt, so misslangen die Versuche mit Papierdreiecken, indem dieselben, ähnlich wie bei MALEK, von den Tieren überhaupt nicht eingezogen wurden. Aus Blättern geschnittene Dreiecke verschiedener Form (Fig. 4) wurden vorwiegend an deren Basis eingezogen (Tab. V), was gegen den massgebenden Einfluss der Form und zugunsten eines solchen des Widerstandes spricht.

In der Mehrzahl der Fälle werden Weidenblätter an der Spitze eingezogen, was dem in dieser Richtung geringeren Widerstand zugeschrieben werden muss. Die Regenwürmer saugen sich gewöhnlich an den mittleren Teilen der Blattspreite fest, wobei der Hauptnerv quer über die Höhlenmündung zu liegen kommt und einen grossen Widerstand leistet. Die lokalen Unterschiede der Nervendicke sind daher von grosser Bedeutung. Die dem Hauptnerven entlang aus Lindenblättern geschnittenen Streifen werden vorwiegend an deren Spitze eingezogen. Wird jedoch der Hauptnerv des Streifens in seinen dickeren Teilen künstlich verdünnt, so dass in seiner ganzen Länge die Nervendicke ungefähr die nähnliche bleibt, so ziehen die Würmer unterschiedlos an den beiden Enden den Streifen ein (Tab. VI). Wenn auch der Einfluss des Widerstandes klar zutage tritt, so macht sich derselbe nur mit einer bestimmten minimalen Grösse des Widerstandes geltend. Solange der Widerstand die Kräfte des Wurmes nicht übertrifft, macht das Tier keine Versuche etwa die Richtung des geringeren Widerstandes zu finden. Junge, weiche Lindenblätter werden in jeder beliebigen Richtung gleich oft eingezogen, ebenso wie aus den distalen Blatteilen geschnittene Kreise (Tab. VI).

Die Beobachtungen der Würmer während der Arbeit konnten eine Zielstrebigkeit des Verhaltens nicht nachweisen.

Beim Einziehen von Kiefernadelpaaren spielt der spezifische Chemismus an der Basis derselben eine wichtige Rolle. Wie aus den Tab. VII — X folgt, ist derselbe lediglich in den basalen Schuppen lokalisiert. Zugleich ist der Widerstand der Nadeln von Bedeutung, indem künstliche Nadelpaare aus Strohhalmen vorwiegend an deren „Basis“ eingezogen wurden (Tab. XI). Weitere Modifikationen der Versuche (Fig. 6, 7 und Tab. XII u. XIII) zeigten, dass die beiden Faktoren: der spezifische Che-

mismus, sowie der Widerstand, voneinander getrennt werden können, indem sie entweder gegeneinander wirken, oder aber summiert werden.

Im theoretischen Teile wird gezeigt, dass in der Arbeit eines Regenwurmes alle Voraussetzungen fehlen, die beim Menschen zur Erkenntnis der Form führen. Es gibt hier kein systematisches Abtasten der Gegenstände, sondern es gibt eine Reihe von Einzelgriffen, die räumlich voneinander sehr weit entfernt sein können und die unmöglich zu einer Formerkenntnis zu führen imstande sind. Das Tier macht keine Versuche die zweckentsprechende Ziehrichtung zu finden, sondern es zieht blindlings an der ersten zufällig angetroffenen Stelle. Der Widerstand spielt sicher eine grosse Rolle, jedoch fehlt auch in diesem Falle jede Bemühung die Richtung des geringeren Widerstandes zu ermitteln. Die Grösse des Widerstandes, sofern sie die Kräfte des Wurmes nicht übertrifft, beeinflusst nicht das Verhalten. In anderen Fällen aber führt aus vielen Einzelbemühungen zufällig eine zum Ziel. Der chemische Faktor ist von Bedeutung, und zwar dürfte derselbe mit der Möglichkeit die eingezogenen Gegenstände als Nahrung auszunützen assoziiert sein. Verffasser hält das Vermögen der Regenwürmer Assoziationen zu bilden für wahrscheinlich, obwohl spezielle Versuche diesbezüglich nicht an gestellt worden sind.

Zagadnienie, czy dżdżownice posiadają pewną dozę inteligencji, bierze swój początek w pracy DARWINA z 1881 r. Obserwując życie dżdżownicy i wpływ jaki wywierają na glebę, zauważył DARWIN, że posiadają one instynkt zatykania otworów norek rozmaitemi przedmiotami, a przede wszystkim liśćmi z drzew, pod któremi znajdują się norki. Liście przeważnie wciągają wierzchołkiem ku norce, igły sosnowe złączone parami — nasadą, trójkąty papierowe — kątem najbardziej ostrym. DARWIN wskazuje, że przedmioty te właśnie w ten sposób najłatwiej dadzą się wciągnąć i robak, chwytając za miejsce umożliwiające wciągnięcie przedmiotu z najmniejszym wysiłkiem, kieruje się inteligencją. Jeśli dać robakom do wcią-

gania liście węższe przy nasadzie, niż przy wierzchołku, to przewaga wciągnięć przechyla się ku nasadzie. Zdaniem DARWINA, wciąganie liści nie jest instynktem, gdyż dżdżownice wciągają w sposób celowy trójkąty papierowe i liście takich drzew, które zostały importowane do Anglii w czasach historycznych, a więc instynkt nie mógł jeszcze się wytworzyć. Sposób wciągania może być nabyty przy pomocy inteligencji i dziedzicznie robakom przekazywany. Na wciągniętych przez robaki trójkątach papierowych pozostają wyraźne ślady chwytów. Ponieważ trójkąty, wciągnięte kątem najbardziej ostrym lub koło niego, na pozostałej powierzchni nie były wcale zabrudzone, wnosi DARWIN, że chwytając od razu za dogodnie do wciągnięcia miejsce bez uprzedniego obmacywania dżdżownice zdradzają wyobrażenie kształtu trójkąta i norki. Igły sosnowe wciągają nasadą, kierując się w tym przypadku najmniejszym oporem. Poza tem przypuszcza DARWIN, że przy nasadzie igieł jest coś przyciągającego robaki, są jakieś substancje chemiczne, wywołujące reakcję dodatnią.

Już w pracy DARWINA spotykamy więc rozróżnienie trzech rodzajów możliwych czynników, jakimi kieruje się dżdżownica przy wciąganiu do norki rozmaitych przedmiotów. Są to: 1^o kształt, 2^o opór, 3^o własności chemiczne. Dżdżownica może kierować się kształtem przedmiotu przy wyborze kierunku najmniejszego oporu.

ELIZA HANEL ('04) dochodzi do wniosku, że w pracy dżdżownicy nie ma przejawów psychiki, że działają tylko podrażnienia natury chemicznej, bądźto dotykowej. Robaki nie mają poczucia kształtu jako takiego, a przy wciąganiu liści gra rolę chemotropizm dodatni względem substancji wierzchołka liściowego. Błazka liściowa działa przyciągająco, ogonek zaś — odpychająco. Ogonek sam, bez błazki, jest dość chętnie brany przez robaki. Jednakże kształt odgrywa ważną rolę. Gdy dżdżownicy podać trójkąt papierowy, to zwierzę obmacuje go systematycznie z różnych stron i w pewnej chwili następuje chwyt. Wrażenia kinestetyczne, spowodowane przez różną siłę i różną kolejność napięcia mięśni, zależą w wysokim stopniu od kształtu obmacywanego przedmiotu i w tem też znaczeniu dżdżownica powoduje się kształtem. Dla trójkątów ostrzakątnych ustala HANEL regułę: refleks chwytu występuje, gdy kolejność obmacywanych boków i kątów jest: krótki bok — kąt — długi bok — kąt. Dzięki temu większość chwytów przypada na kąt najbardziej ostry. Tem się również tłumaczy przewaga nasady przy wciąganiu połączonych ze sobą par igieł sosnowych, które można uważać za trójkąt otwarty z jednej strony i posiadający ostry kąt koło 30°. HANEL odrzuca możliwość dziedziczenia doświadczeń, które są cechami nabytymi. Praca robaka nie wykazuje celowości, lecz jest szeregiem refleksów na podrażnienia mechaniczne. Wnioski HANEL są oparte na badaniu przedmiotów, wciągniętych do norki przez dżdżownicę. Jednak samego procesu wciągania autorka nie obserwowała.

JORDAN ('13) pierwszy obserwował pracę dżdżownic w warunkach naturalnych, w ogrodzie przy słabem świetle lampy. Stwierdził, że robaki nie obmacują trójkątów, lecz chwytają je w punkcie dowolnym. Tem samem upada hipoteza kolejności podrażnień. Chwyty są zupełnie przypadkowe i w pracy robaka wyraźnie występuje metoda „trial and error“ JENNINGSA ('10).

Brak celowości pracy wynika z faktu, że robak często porzuca uchwycony wierzchołek, by chwycić za miejsce o wiele bardziej niedogodne.

MANGOLD ('25) badał czynniki, działające przy wciąganiu przez robaki liści, igieł sosnowych oraz rozmaitych innych przedmiotów. Obserwował dżdżownice w terarjach, w nieopalanym pokoju, w których to warunkach pracowały normalnie. Liczne obserwacje procesu wciągania wykazały, że: 1°. Chwyt następuje w punkcie, w którym głowa robaka po raz pierwszy styka się z liściem. 2°. Gdy dżdżownica ciągnie liść ku norce, ogonek opiera się o ziemię i działa na podobieństwo steru, skierowując liść wierzchołkiem naprzód; również i położenie środka ciężkości liścia bliżej nasady wpływa na jego zwrot wierzchołkiem w kierunku norki. 3°. Robak wielokrotnie puszcza liść w trakcie wciągania, chwytając go w coraz to innym punkcie. 4°. Opór przy wierzchołku jest najmniejszy, gdyż tam nerwy są najcieńsze. 5°. Jest wyraźna różnica w chemizmie blaszki i ogonka. Pęczki związanych igieł sosnowych, wymoczone w zakwaszonym alkoholu w celu usunięcia ewentualnych różnic chemizmu i moczone następnie jednym końcem w żelatynie z rozartami drobno suchymi wierzchołkami liści, drugim zaś w żelatynie z rozartami ogonkami, w ogromnej większości przypadków zostały wciągnięte tym pierwszym końcem naprzód. Igły sosnowe są częściej brane za podstawę, gdyż: 1°. Jest to najdogodniejsze miejsce przyssania. 2°. Przy wciąganiu za jedną igłę, druga oparłaby się o brzeg norki. 3°. Jest coś przyciągającego dla robaka przy podstawie. 4°. Ze względu na wymiary przyssawki, pochwycenie igły pojedynczej jest o wiele trudniejsze, niż chwyt u nasady, gdzie igły są złączone. 5°. Dotknięcie łusek u podstawy igieł, wymoczonych uprzednio w zakwaszonym alkoholu, nie powoduje żadnej różnicy zachowania się w porównaniu z dotknięciem wierzchołków.

Odrzuca autor kategorię twierdzenie DARWINA, że dżdżownice posiadają wyobrażenie kształtu, oraz hipotezę HANEL o kolejności podrażnień. Przy wciąganiu przedmiotów chemicznie jednorodnych gra rolę tylko opór. Opierając się na pracach YERKESA ('12) i HECKA ('19/20), uważa MANGOLD gromadzenie doświadczenia indywidualnego przez dżdżownice i tworzenie skojarzeń za możliwe. Jednak w warunkach przyrodzonych może to grać rolę tylko podrzędna, ponieważ robaki wykonywują nieraz dalekie wędrówki, podczas których stykają się z przedmiotami coraz to innego kształtu. W przypadku igieł sosnowych warunki są bardziej jednolite i dlatego też powstanie trwałego skojarzenia mechanicznie najdogodniejszego punktu chwytu z podniętą chemiczną przy nasadzie jest do przyjęcia.

Ostatnią publikacją w tej dziedzinie jest praca MALEKA ('27). MALEK przeprowadzał doświadczenia tylko w naturalnych warunkach, gdyż w skrzyniach dżdżownice wcale nie pracowały. Autor wnosi, że dżdżownica potrafi się uczyć i nauka idzie tem szybciej, im dana czynność dla życia robaka jest potrzebniejsza. Jeżeli po pewnej liczbie chwytów nie uda się robakowi liścia wciągnąć, to dżdżownica nie próbuje już więcej. Szybkość tworzenia się skojarzeń jest różna dla rozmaitych czynności. Jedne czynności są plastyczne bardziej lub mniej — inne wcale, i od tego zależy

szybkość tworzenia się asocjacji. Robak porusza się niesystematycznie, więc nie poznaje kształtu. Ma jednak wycucie przestrzeni i bardzo rozwinięty zmysł dotyku. Może rozróżnić przedmioty z położenia w przestrzeni, lub z ich własności chemicznych. Liścia, który był przytwierdzony i ciągnięty przez robaka do 12 razy, dżdżownice nie ciągną już wcale, a jeśli go podać na innym miejscu, chwytają, ciągną 2—3 razy i puszczaają. Liść poznał robak po pozostałej na nim ślinie. W każdym razie pewną dozę doświadczenia robak osiągnąć może.

Zagadnienie sprowadza się więc właściwie do dwu punktów.

1°. Czy robaki są zdolne gromadzić doświadczenia i asocjacje pamięciowe, a co za tem idzie, czy posiadają pewną dozę inteligencji?

2°. Jakie czynniki wpływają na sposób pracy dżdżownicy?

W pracy niniejszej uwzględniam jedynie to drugie zagadnienie.

Materiał i metody.

Doświadczenia wykonywałam na dużych osobnikach *Lumbricus terrestris*. Dżdżownice trzymałam w skrzyniach w piwnicy oraz na gazonie w ogródku. Przez dłuższy czas nie udawało mi się stworzyć odpowiednich warunków w piwnicy, aby dżdżownice intensywnie wciągały podawane im przedmioty. Wreszcie po wielu próbach udało się dostosować wilgotność i stopień ubicia ziemi o tyle, że w ciągu całej zimy miałam w piwnicy 20—30 dżdżownic, które dość dobrze pracowały. Skrzynie miałam różnej wielkości, nasypywałam do nich 20—30 cm wysoko ziemi zwykłej, nieprzesianej, gdyż pomimo usilnych starań w przesianej ziemi dżdżownice wcale wciągać nie próbowały. Pod koniec zimy obgryzały na powierzchni dawane im liście, ale ani jednego nie wciągnęły. Ziemię podlewałam codziennie, by była miernie wilgotna. Wpuszczałam do każdej skrzyni 20—40 robaków. Dżdżownice wybierałam duże, gdyż małe wciągają przedmioty drobne, trudne częstokroć do obserwacji. Z pośród 20—40 wpuszczonych do każdej skrzyni dżdżownice pracowało 5—10, i nie miałam możności sprawdzić, czy stale pracują te same osobniki, gdyż norki w skrzyniach nie były stałe: coraz to były w innym miejscu, zrobione niedbale. Oświetlałam skrzynie przez parę godzin dziennie światłem żarówki elektrycznej, by chociaż w przybliżeniu zachować rytm dziennie-nocny pracy robaków. Codziennie w południe kładłam przedmioty, które miały dżdżownice podczas nocy wciągnąć—rano sprawdzałam ile i jak zostało wciągniętych.

W ogródku na gazonie porośłym trawą oraz na ścieżce miałam przeszło 200 nerek zamieszkałych przez duże *Lumbricus terrestris*. Ścinałam trawę tuż przy ziemi, by nie przeszkadzała przy ciągnięciu liści przez robaka. Każda norka zaopatrzona była w numer. Norki były stałe. Ponumerowałam je na jesieni, a na wiosnę stwierdziłam, że są w tem samym

miejscu. Czy są w nich stale te same osobniki nie mogę stwierdzić, więc trudno jest wnioskować coś o indywidualności poszczególnych numerów. Oczyszczałam oraz podlewałam gazon w południe, lub nad wieczorem, pozostawiałam norki otwarte. Robaki po pewnym czasie zatykały je ekskrementami i wychodziły dopiero w nocy. Kładłam koło otworów różne przedmioty, jak liście, igły sosnowe, patyczki i t. p. Sprawdzałam rano, ile i jak zostało wciągniętych. Przedmioty uważałam za wciągnięte, gdy ponad otworem norki sterczało mniej niż połowa obiektu wciągniętego. Poza masowymi doświadczeniami obserwowałam dżdżownicę przy pracy, zarówno w ogrodzie jak i w skrzyniach.

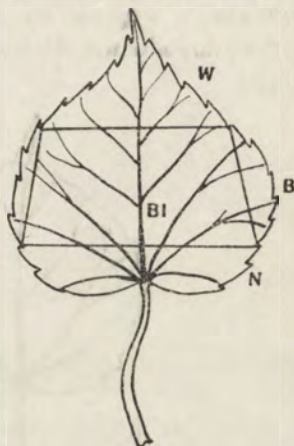
Metody, dotyczące poszczególnych doświadczeń, podam przy opisie tychże.

Wciąganie liści.

Na jesieni w ogrodach, zarówno na ścieżkach jak i na trawnikach, można zauważyć nagromadzenia liści w postaci małych kopców, dosyć gęsto obok siebie leżących. W tych nagromadzeniach część liści jest luźno ułożona, a część tkwi w otworze norki dżdżownicy. Według DARWINA, około 79% takich liści mają wierzchołki skierowane ku norce. Analogiczny wynik otrzymali HANEL i MANGOLD. Aby to sprawdzić, dawałam dżdżownicom liście rozmaitych gatunków drzew. Dla rejestracji wciągnięć odróżniałam 4 części liścia: wierzchołek — *w*, nasadę — *n*, krawędź boczną — *b*, środkową część blaszki — *bl* (rys. 1).

Częstokroć liść po wyjęciu z norki jest tak pomięty i skłębiony, że trudno jest oznaczyć punkt, za który został wciągnięty. Dżdżownica nie ciągnie stale za jedno raz uchwycone miejsce blaszki, lecz coraz to przysysa się w nowem. Takich wątpliwych liści w obliczeniach nie uwzględniałam.

Z przytoczonej tabeli I wynika, że istotnie jest znaczna przewaga wciągnięć za wierzchołek liściowy. Liście jesionu, akacji i lipy w niektórych przypadkach zostały wciągnięte środkową częścią blaszki.



Rys. 1. Schemat liścia. W — wierzchołek, N — nasada, B — brzeg, BI — środkowa część blaszki.

Fig. 1. Die in den Tabellen bezeichneten Blattteile.

Tabela I.

Wciąganie liści opadłych, z ogonkami. We wszystkich tabelach *i* — oznacza ogólną ilość obiektów wciągniętych, *w* — procent wciągniętych wierzchołkiem, *n* — nasadą, *b* — brzegiem, *bl* — środkową okolicą blaszki.

Einziehen abgefallener Blätter. In allen Tabellen bedeutet: i — die Gesamtanzahl eingezogener Gegenstände, w — eingezogen an der Spitze in Proz, n — an der Basis, b — am Rande, bl — an den mittleren Teilen der Blattspreite (vgl. Fig. 1).

Rodzaj obiektu Objekt	<i>i</i>	<i>w</i>	<i>n</i>	<i>b</i>	<i>bl</i>
Jesion <i>Esche</i>	117	84.6	12.0	—	3.4
Akacja <i>Akazie</i>	172	52.9	23.3	—	23.8
Lipa <i>Linde</i>	189	65.6	15.9	—	18.5
Brzoza <i>Birke</i>	122	73.0	12.3	14.7	

Robak przysysa się w pobliżu środka liścia i ciągnąc zgniata i wygina go. Liście brzozy są stosunkowo sztywne i prawdopodobnie dlatego ten typ wciągnięć dla brzozy nie wystąpił.



Rys. 2. Kształt liści: A — lipa, B — brzoza, C — wierzba, D — listek jesionu, E — listek akacji.

Fig. 2. Die Blattform: A—Linde B—Birke, C—Weide, D—Esche E—Akazie.

Fakt znacznej przewagi wierzchołka nie ulega wątpliwości. Śladem DARWINA, wyróżniam tu trzy możliwe grupy czynników: 1°. Chemizm. Może istnieć pewna różnica w chemizmie poszczególnych okolic blaszki. Jakiś czynnik chemicznie dodatni dla dżdżownicy może tkwić w wierzchołku liścia. 2°. Kształt. Kształt obiektu wciąganego może w specjalny sposób podrażniać dżdżownicę, niejako zmusza do chwytania w pewien określony, dogodny do wciągania sposób. 3°. Opór. Liść przy wciąganiu do norki stanowi opór, dzięki unerwieniu, inny w każdej okolicy blaszki.

Analiza zmysłu chemicznego.

Według HANEL ('04), ogonek w porównaniu z blaszką wpływa odpychająco. Aby uprościć warunki, uciniałam zupełnie ogonek. Pomimo to przewaga wciągnięć za wierzchołek była znaczna, co widać w tabeli II.

Tabela II.

Wciąganie liści z odciętymi ogonkami.
Einziehen von Blättern mit abgeschnittenen Stielen.

Rodzaj obiektu <i>Objekt</i>	<i>i</i>	<i>w</i>	<i>n</i>	<i>b</i>	<i>bl</i>
Lipa <i>Linde</i>	187	64.7	16.6	9.6	9.1
Wierzba <i>Weide</i>	201	62.7	19.4		17.9

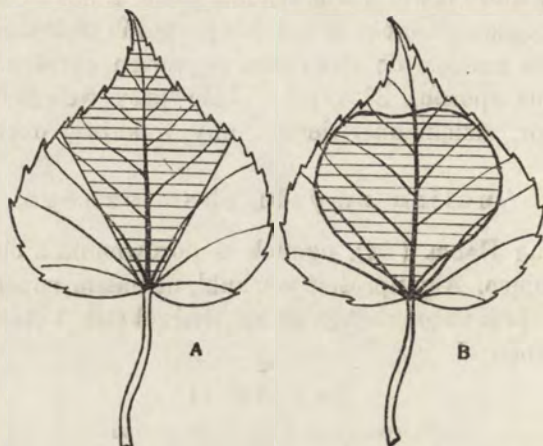
HANEL wykonała następujące doświadczenie, z którego wnioskuję o chemicznym zróżnicowaniu blaszki liściowej. Dawała dżdżownicom do wciągania wycinki z liści lipy, szerokie przy wierzchołku liściowym, wąskie przy ogonku (rys. 3a).

Dżdżownice wciągały za szeroką część blaszki, chociaż biorąc w ten sposób musiały przewycięzać większy stosunkowo opór.

Zmodyfikowałam nieco doświadczenie HANEL. Z dużego liścia lipy wycinałam liść mniejszy o normalnym kształcie w ten sposób, że gdzie był wierzchołek, obecnie była nasada liścia i odwrotnie (rys. 3b). Dżdżownice wciągały za obecną nasadę (część wierzchołkowa liścia) procentowo większą ilość razy, niż za nowy wierzchołek.

Wynik doświadczenia zdaje się istotnie przemawiać za istnieniem pewnego specyficznego chemizmu w okolicach wierz-

chołka liścia. Dżdżownice nie kierują się kształtem, gdyż jakkolwiek kształt liścia został niezmieniony, większość chwytów przypadła na nową nasadę. Jednakże ze względu na cieńsze nerwy w okolicy wierzchołka, sprawa oporu nie jest tu przejrzysta.



Rys. 3. Wycinki z liścia lipy.

Fig. 3. Ausschnitte aus Lindenblättern.

Należało tak przeprowadzić doświadczenie, by w obiekcie wciągającym ani opór, ani kształt nie mogły wpływać na sposób wciągania. W tym celu posługiwałam się metodą patyczków pokrytych żelatyną (MANGOLD), gdzie jedynie występowały różnice chemizmu.

Tabela III.

Wciąganie wycinków w kształcie liści lipy.

Einziehen der in Gestalt von Lindenblättern ausgeschnittenen Blattstücke.

<i>i</i>	<i>w</i> (Nasada liścia) (Blattbasis)	<i>n</i> (Wierzchołek liścia) (Blattspitze)	<i>b</i>	<i>bl</i>
147	25.9	57.1	14.3	2.7

Doświadczenie przeprowadzałam w sposób następujący.

Patyczki, używane do robót koszykarskich, o średnicy 2—3 mm, cięłam na kawałki 5 cm długie. Suszyłam liście, ucinałam wierzchołki, względnie nasady mniej więcej w odległości 1 cm od brzegu i rozcierałam w moździerzu na proszek. Tak samo postępowalam z ogonkami. Następnie odważałam 0.14 g proszku i 0.20 g żelatyny, zalewałam to 4.5 cm wody

cieplej i pozostawiałam na przeciąg $\frac{1}{2}$ godziny. Do takiej proporcji doszłam doświadczalnie, gdyż otrzymana w ten sposób gęstość płynu była najdogodniejsza przy smarowaniu patyczków. Otrzymanym wyciągiem, nieco ogrzanym, by żelatyna mogła się dobrze rozpuścić, pokrywałam 70 — 80 patyczków na przestrzeni koło 15 mm od obu końców. Przyrządzałam patyczki serjami, t. zn. w pierw jedno końce 35 patyczków, np. wyciągiem z wierzchołków, inne 35 wyciągiem z nasad. Drugie końce patyczków preparowałam, gdy pierwsze wyschły dostatecznie. W tej metodzie ewentualne różnice stopnia wysuszenia obu końców nie mogły wpłynąć na wynik, co ma duże znaczenie, gdyż zauważyłam, że dżdżownice chętniej biorą patyczki pokryte wilgotną żelatyną, niż już wyschnięte. Koło każdej norki kładłam po 3 patyczki w taki sposób, by tworzyły trójkąt równoboczny, w którego środku leży otwór rurki. Przy takim układzie patyczków prawdopodobieństwo pierwszego chwytu dla obu końców jest takie same. Codziennie rano wyjmowałam z nerek patyczki wciągnięte, pozostałe usuwałam i kładłam świeże. Wynik tych doświadczeń ilustruje tabela IV.

Tabela IV.

Wciąganie patyczków, pokrytych proszkiem z poszczególnych części liścia, oraz czystą żelatyną.

Einziehen von mit zerriebenen Blattteilen und mit Gelatine bedeckten Holzstäbchen.

№	Blattsorte	Objekt pokryty: Provenienz des Pulvers	i	w	n	Ogonek Stiel	Żelatyna Gelatine
1	Lipa <i>Linde</i>	Wierzchołki-nasady <i>Spitze und Basis</i>	155	51.0	49.0	—	—
2	"	Wierzchołki-ogonki <i>Spitze und Stiel</i>	106	67.9	—	32.1	—
3	"	Nasady-ogonki <i>Basis und Stiel</i>	93	—	77.4	22.6	—
4	"	Wierzchoł.-żelatyna <i>Spitze und Gelatine</i>	133	92.5	—	—	7.5
5	"	Nasady-żelatyna <i>Basis und Gelatine</i>	103	—	91.2	—	8.8
6	"	Ogonki-żelatyna <i>Stiel und Gelatine</i>	116	—	—	83.6	16.4
7	Wierzba <i>Weide</i>	Wierzchołki-nasady <i>Spitze und Basis</i>	104	48.1	51.9	—	—

W próbach tych czynnik lokalnych różnic oporu i kształtu został całkowicie wyłączony, gdyż patyczki były jednostajnej grubości. Doświadczenia 4, 5 i 6 tabeli stanowią kontrolę. Wynika z nich, że dżdżownica bardzo dobrze odróżnia czystą żelatynę od żelatyny, zmieszanej z proszkiem liściowym, czyli substancja liścia, w porównaniu z żelatyną, wywiera wpływ wyraźnie dodatni na wciąganie. Wpływ ten jest mniej więcej jednakowy dla proszku, pochodzącego z wierzchołków liści, jak i nasad, natomiast jest nieco słabszy dla sproszkowanych ogonków.

W zupełnej zgodzie z tem są wyniki pozostałych doświadczeń tabeli. Nasady liścia robak nie odróżnia pod względem chemiczno-dotykowym od wierzchołków (doświadczenia 1 i 7), natomiast odróżnia wierzchołki od ogonków (dośw. 2) i nasady od ogonków (dośw. 3).

Fakty powyższe niewątpliwie wskazują, że przy wyborze kierunku wciągania dżdżownica może powodować się własnościami chemiczno-dotykowymi wciąganych przedmiotów, różniami w poszczególnych ich punktach. Ale ponieważ operowałam liśćmi z uciętym ogonkiem, przewaga wierzchołków tabeli II nie może zależeć od lokalnych różnic chemicznych liścia. W nieobecności ogonka dżdżownica nie odróżnia wierzchołka liścia od jego nasady.

Analiza zmysłu kształtu.

Próby ze stosowaniem przez DARWINA i HANEL trójkątami z papieru nie udały się. Dżdżownice ani w piwnicy, ani w ogródku nie wciągały prawie zupełnie trójkątów papierowych, musiałam więc papier zastąpić czemś innym. Ponieważ stwierdziłam, że blaszka pod względem chemicznym jest jednorodna, mogłam z liści wycinać objekty rozmaitego kształtu. Liście takie dżdżow-

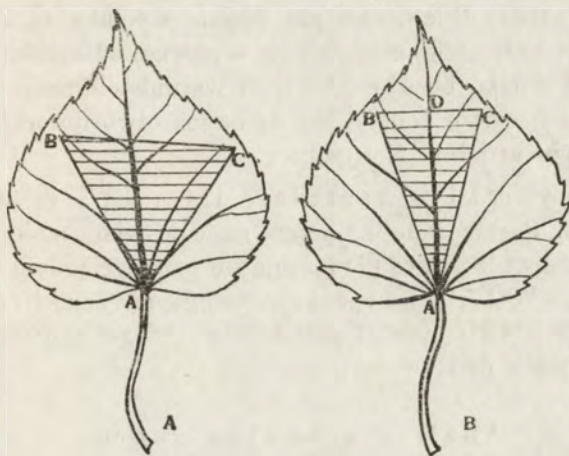
Tabela V.

Wciąganie trójkątnych wycinków z liścia lipy.
Einziehen von Dreiecken aus Lindenblättern.

Rodzaj obiektu <i>Objekt</i>	<i>i</i>	A	B	C
Trójkąty równoboczne <i>Gleichseitige Dreiecke</i>	110	18.2	23.6	58.2
Trójkąty równoramienne <i>Gleichschenklige Dreiecke</i>	137	19.0	37.2	43.8

nice po wciągnięciu do norki mogą zużytkować jako pokarm, dlatego też chętnie były brane i w dużych ilościach. Nerw główny liścia wpływa na rozłożenie oporu. Usiłowałam tak dobrać położenie nerwu w wycinku, by można było przewidzieć, w jakim miejscu opór będzie największy. Wycinki były trzech rodzajów: a) trójkąty równoboczne, b) trójkąty równoramienne, c) wycinki w kształcie liści lipy (wycięte z drugiego liścia lipy w kierunku odwrotnym). Wyniki przedstawia tabela V.

a) Trójkąty równoboczne. Do dużych liści lipy przykładalam model trójkąta równobocznego o boku 4.5 cm wycięty z tektury i posiadający linię AD. Punkt A przykładalam do nerwu głównego liścia tuż przy ogonku, punkt D również do nerwu i wzdłuż boków modelu obcinałam liść (rys. 4a).



Rys. 4. Wycinki trójkątne z liścia lipy.

Fig. 4. Dreiecke aus Lindenblättern.

Opory teraz przy każdym kącie trójkąta są różne. Kąty zaś i boki trójkąta są równe, przeto podnieta kształtu nie może wpływać na uprzywilejowanie jakiejś części wycinka. Jeżeli dżdżownice powodują się kształtem przedmiotu, to powinny były wciągnąć jednakową ilość razy za każdy z trzech kątów. Tymczasem, jak widać w tabeli V, przewaga wciągnięć jest przy kącie C i to w 58.2%. Ponieważ w doświadczeniu wyłączyliśmy czynniki kształtu i chemizmu, więc jedynie wpływem trzeciego czynnika, czynnika oporu, wynik otrzymany możemy wytłumaczyć.

b) Trójkąty równoramienne. Wycinałam z liści lipy trójkąty równoramienne o boku 5.5 cm i podstawie 2.5 cm. Nerw stanowił wysokość trójkąta, przyczem najgrubsza jego część znajdowała się przy wierzchołku trójkąta, najcieńsza przy podstawie (rys. 4b).

Sądząc z kształtu, powinny dżdżownice najczęściej chwycić za kąt najostriejszy. Tak było istotnie w doświadczeniach DARWINA i HANEL z trójkątami papierowymi. Jednakże w mojem

doświadczeniu nastąpiło coś wręcz przeciwnego. Przeważna ilość wciągnięć (81% całości) przypada na dwa kąty przy podstawie. Taki wynik również można wytłumaczyć jedynie działaniem czynnika oporu, gdyż blaszka przy podstawie trójkąta jest najbardziej wiotka, przy wierzchołku zaś gruby nerw stanowi opór przy wciąganiu. Jak wykażę poniżej i jak to wynika również z obserwacji MANGOLDA, dżdżownica nie ciągnie wycinka za sam wierzchołek, lecz najczęściej przysysa się w pewnej odległości od niego, w kierunku środka blaszki. W tych warunkach przy wciąganiu gruby nerw liściowy kładzie się wpoprzek otworu norki, co oczywiście bardzo utrudnia wciąganie.

c) Wycinki w kształcie liści lipy (o unerwieniu odwrotnym). Przytaczane już przeze mnie doświadczenie tego typu wykazało, że dżdżownice nie kierują się przy wciąganiu kształtem przedmiotu. W 57.1% przypadków wciągają wycinki częścią nasadową (tabela III). Kształt przedmiotu wciąganego nie wpływa na wynik pracy dżdżownicy.

Analiza czynnika oporu.

Jako punkt wyjścia posłużyło mi doświadczenie z liśćmi wierzby. Liście są tu jednakowo szerokie przy wierzchołku i nasadzie. Ucinając ogonek, mogłam wyeliminować czynnik kształtu. Na obu końcach liść różni się jedynie grubością nerwu, która jest znacznie większa przy nasadzie. Po przeprowadzeniu doświadczenia z wyciągiem żelatynowym z wierzchołków i nasad liści wierzby stwierdziłam, że lokalne różnice chemizmu nie wpływają na wynik wciągania. Ponieważ czynnik kształtu również nie mógł odgrywać roli decydującej, ze względu na równomierną budowę blaszki, znaczną przewagę wciągnięć wierzchołkiem (tabela II) należy przypisać mniejszemu w tym kierunku oporowi.

Dżdżownica może w dwojaki sposób liść wciągać. Może chwycić za brzeg blaszki, wtedy liść opiera się krawędziami o brzeg norki i zostaje do niej wsunięty, lub też może przysysać się do powierzchni blaszki. W tym ostatnim przypadku liść pokrywa norkę i dżdżownica, znajdując się pod nim, usiłuje liść wygiąć. Opór w obu przypadkach jest oczywiście zupełnie różny.

Obserwując dżdżownice przy pracy, zauważyłam, że chwytają one za pierwsze napotkane miejsce, więc ciągną zarówno za

brzeg, jak też przysysają się do blaszki. Wykonałam próbę wy-mierzenia oporów liści, wciąganych w różnych kierunkach. W tym celu zaciskałam brzeg liścia: jego nasadę, wierzchołek lub kra-wędź boczną, w wąskich szczypcykach drewnianych, które wsu-wałam do otwartej rurki szklanej odpowiedniej średnicy. Rurkę ustawiałam pionowo, liściem opierającym się krawędziami o brzeg otworu rurki, ku górze. Obciążając szczypczyki od dołu, można było oznaczyć ciężar w gramach, który wystarczał do całkowi-tego wciągnięcia liścia do rurki. Jednakże metoda ta nie dała jasnych wyników, gdyż taki sposób wciągania liścia różni się bardzo od zwykłej metody pracy dżdżownicy. Idzie o to, że w trakcie wciągania wielkość oporu liścia zmienia się z każdą chwilą zależnie od położenia liścia względem norki i stopnia jego sfałdowania. Dlatego też punkt liścia, za który ciągnie dżdżow-nica, nie jest stały, lecz zmienia się wielokrotnie w ciągu pracy, co jest bardzo trudne do ilościowego uwzględnienia. Do tego robak bardzo często przysysa się do środkowych części blaszki, co prowadzi do zgięcia i sfałdowania liścia, stwarzając zupełnie nowe warunki oporu. Naprzykład, opadły liść lipy, przy wciąganiu go do rurki szklanej za wierzchołek, stanowi nieco większy opór, niż wciągany za nasadę. A jednak przy chwycie za powierzchnię blaszki grube nerwy w pobliżu nasady bardzo silnie opierają się zgięciu, więc też rzeczywisty opór w tej okolicy jest nierównie większy. Zastosowałam więc inną metodę.

Wycinałam z dużych liści lipy paski wzdłuż nerwu. Obydwa końce paska były identyczne pod względem kształtu i cały wycinek różnił się na obu końcach jedynie grubością nerwu. Dżdżownice wciągały paski chętnie i częstokroć po wyjęciu z norki paski były przy końcu zgięte. Z tego można sądzić, że dżdżownica przeważnie ciągnie za blaszkę, a nie za jej brzeg. Znaczna przewaga wciągnąć przypada na część wierzchołkową (tabela VI).

W innym doświadczeniu ścinałam nerw od połowy aż do nasady liścia tak, że elastyczność paska była na całej długości mniej więcej jednakowa. Wynik wciągania okazał się zupełnie zgodny z mojem przypuszczeniem. Z chwilą, gdy opór został zrównany na obu końcach, jednakowo często dżdżownice wcią-gały za wierzchołek i nasadę. Prócz tego doświadczenie to po-twierdza, że niema wewnątrz blaszki żadnych zróżnicowań che-

miecznych, któreby wpływały na sposób pracy robaka. Po zrównaniu oporów dżdżownica nie odróżnia obu końców paska. Jednocześnie nie jest prawdopodobne, aby tak prosty zabieg, jak ścięcie nerwu głównego, spowodował dokładne zrównanie oporów obu końców paska. Raczej należy wnosić, że dżdżownica kieruje się oporem dopiero zaczynając od pewnej minimalnej wielkości tegoż. Jeśli opór nie przewyższa sił robaka, to dżdżownica nie wyszukuje kierunku najmniejszego oporu, lecz ciągnie liść w jakimkolwiek kierunku przypadkowym. Dopiero gdy opór staje się nadmierny, zwierzę zmienia miejsce przyczepu, porzucając je zawsze w chwili, gdy oporu nie zdoła przezwyciężyć. Słuszności

Tabela VI.

Wciąganie młodych liści lipy i wycinków z liści starszych.
Einziehen junger Lindenblätter sowie der Ausschnitte aus älteren Blättern.

Rodzaj obiektu Objekt	<i>i</i>	<i>w</i>	<i>n</i>	<i>b</i>	<i>bt</i>
Paski z lipy <i>Streifen aus älteren Blättern</i>	104	75.0	16.4		8.6
Paski z lipy z nerwem ściętym przy nasadzie <i>Streifen mit gleichmässig dick gemachtem Hauptnerv</i>	111	46.8	47.8		5.4
Młode liście lipy bez ogonk. <i>Junge Blätter ohne Stiel</i>	105	43.8	26.7	25.7	3.8
Krażki wycięte z liścia lipy <i>Kreise aus älteren Blättern</i>	105	33.3	32.4	28.6	5.7

tej interpretacji dowodzi wynik osiągnięty z wciągania świeżych liści lipowych. Na wiosnę dawałam dżdżownicom do wciągania młode liście, jeszcze zupełnie miękkie. Liść taki jest wiotki i wciągnięcie go do norki w każdym kierunku jest dla dżdżownicy możliwe. Wynik doświadczenia wskazuje, że z chwilą, gdy nerwy bliższe nasady nie stanowią absolutnego oporu tak znacznego, jak przy liściach jesiennych, procent wciągnięć za wierzchołek spada z 64% na 43% (tabela VI).

Wreszcie dawałam dżdżownicom do wciągania wycinki z lipy w kształcie prawidłowych krążków, których średnicą był nerw główny. Średnica krążka wynosiła 35 mm. Podnieta kształtu została wyeliminowana, chemizm (jak stwierdziłam uprzednio) jest taki sam na całej rozciągłości blaszki. Ponieważ krążki wycinałam małe i blisko wierzchołka, nerw na całej średnicy był ela-

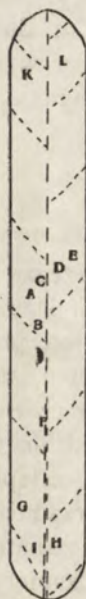
styczny i łatwy do zgięcia. Przeto i czynnik oporu (przyjmując, że dżdżownica ciągnie kółko przez przyssanie i usiłuje je zgiąć) został usunięty, gdyż opór absolutny w żadnym kierunku nie był nadmierny. Jak widać w tabeli VI, dżdżownice jednakowo często chwytają za każde miejsce na obwodzie koła.

Ze wszystkich faktów powyższych wnioskuję, że jedynie opór wciąganych liści określa sposób pracy dżdżownicy. Czynniki kształtu i lokalnych różnic chemizmu możemy z dużym stopniem prawdopodobieństwa wyeliminować. Fakt ten wynika również wyraźnie z obserwacji samego procesu wciągania, do którego opisu się zwracam.

Obserwacje pracy dżdżownic.

Obserwacja dżdżownic przy wciąganiu liści jest rzeczą bardzo żmudną, gdyż nieraz wymaga całonocnej ciągłości. Dżdżownica często z niewiadomych przyczyn porzuca obiekt wciągany, aby do niego nie powrócić, lub powraca doń dopiero nad ranem. Obserwowałam dżdżownice w ogródku, oświetlając je czerwoną latarką, oraz w skrzyniach. Dżdżownica przez cały dzień tkwi przy otworze norki, który jest zatkany liśćmi, lub zalepiony ekskrementami. O zmierzchu wysuwa wolno z norki przednią połowę ciała i robi ruchy kołowe, macając po drodze napotkane grudki ziemi, żdźbła trawy i t. p. Gdy natrafi na podsunięty jej liść lub inny jaki obiekt, przysysa się w pierwszym napotkanem miejscu i albo ciągnie parę razy słabo, jakby dla zorientowania się w ciężarze, albo odrazu paroma silnemi skurczami dociąga liść do otworu norki. Teraz, czy liść zostanie odrazu wciągnięty czy nie, zależy od miejsca, za jakie został uchwycony. Jeśli np. pasek z liścia chwyciła dżdżownica za brzeg, czy to przy wierzchołku, czy przy nasadzie, pasek zostanie paroma silnemi ruchami do norki wciągnięty. Jeżeli zaś przyssanie się nastąpiło w jakimkolwiek punkcie blaszki, robak musi liść zgiąć, by go wciągnąć, i tu już zadanie staje się o wiele trudniejsze. Jeżeli dżdżownica uchwyciła liść w okolicy wierzchołka, gdzie nerw jest cienki, to liść zostaje wciągnięty „wierzchołkiem“, ze zgiętą blaszką. Jeżeli uchwyciła blaszkę bliżej nasady, to nerw nie zgina się, pasek liściowy przez elastyczność odskakuje od otworu gębowego dżdżownicy. Robak zaczyna chwytać liść w rozmaitych punktach, usi-

łując go wciągając. Staralam się sprawdzić, czy dżdżownica ma pewien plan pracy, czy też chwyta pasek zupełnie przypadkowo. W tym celu podawałam dżdżownicy pasek z liścia lipy tak, by uchwyciła go w środku blaszki tuż koło nerwu. Dżdżownica dociąga taki pasek do norki, przykrywa nim otwór, nad którym znajduje się środek paska. Sam robak, pozostający w norce,



Rys. 5. Pasek wycięty z liścia lipy. Kolejność liter oznacza takąż kolejność chwytów.

Fig. 5. Streif aus Lindenblatt. Die Reihenfolge der Buchstaben entspricht der Reihenfolge der Ansaugpunkte.

ciągnie liść od spodu. Poczynając od tej chwili, notowałam wszystkie kolejne chwytów dżdżownicy, usiłując odnaleźć w nich jakąś prawidłowość. Pomimo wielu obserwacji nie udało mi się wykryć systemu pracy dżdżownic i przewidzieć jaki ruch następnie robak wykona. Ruchy są tak przypadkowe, tak często dżdżownica opuszcza miejsce bardzo dogodne do wciągnięcia, by przyssać się i bezowocnie ciągnąć za inne, niedogodne, że trudno jest przypuścić, by jej zachowanie się było celowe. Raczej otrzymuje się wrażenie, że z pośród wielu przypadkowych chwytów wcześniej czy później jeden będzie celowy i ten umożliwi zwierzęciu częściowe wciągnięcie liścia do norki. Jednak, gdy blaszka liściowa częściowo już znikła pod ziemią, w pracy dżdżownicy występuje pewna prawidłowość. Robak nie wciąga liścia za jednym zamachem, lecz coraz to zmienia punkt przyssania, przynosząc go coraz wyżej. Trudno jest przypuścić, aby powodem takiego postępowania był nadmierny wzrost oporu wciąganego liścia i poszukiwanie punktu, w którym wysiłek wciągania byłby najmniejszy. Skoro liść dostał się do kanału norki, prze-

niesienie chwytu do punktu, położonego wyżej może tylko spowodować skłębienie się liścia i wzrost oporu. Ciągnąc go za najgłębiej w norce położony punkt, dżdżownica miałaby do pokonania opór mniejszy. Prawdopodobnie zmiany chwytów zależą od tego, że tylna, siedząca w norce część ciała robaka jest mocno zahaczona o ścianki i nie zmienia swego położenia względem norki. Podczas pracy wciągania wyciąga się i kurczy tylko przednia połowa ciała. W tych warunkach robak musi oczywiście chwytać liść coraz wyżej, chociaż-

by opór przytem wzrastał. Nieraz stwierdziłam, że robak wciąga liść np. nasadą, zaś po wyjęciu liścia całkowicie wciągniętego okazuje się, że jego wierzchołek leżał głębiej, niż nasada. Stosunki te można wytłumaczyć tylko zmianą chwytów, nie liczących się z oporem, o ile oczywiście nie przewyższa on sił robaka. Ale w tym ostatnim przypadku zwierzę porzuca liść i próbuje innych chwytów, zanim nie nastąpi właściwy. Dla przykładu przytoczę parę protokółów.

I. Dn. 13. IX. 1929 r.

Godz. 7⁰⁰ wieczorem. Obserwacje w ogródku. Dżdżownica, obmacując wkoło norki, dotknęła wierzchołka liścia lipy, przysssała się i dociągnęła liść do norki. Uchwyciła za wierzchołek i wciągnęła liść do norki o tyle, że stoi on pionowo. Teraz pracuje dżdżownica w głębi norki, nazewnątrz widać tylko, że liść pogrąża się coraz głębiej. Jest wciągnięty za „wierzchołek“ (całość trwa 5 minut).

II. Dn. 13. IX. 1929 r.

Godz. 8 wieczorem. Dżdżownica chwytą za poruszony brzeg, ciągnie do norki. Następnie przysysa się w punkcie bliskim wpierv uchwyconego i liść zostaje wciągnięty za brzeg. Całość trwa do 10 minut. Po godzinie wyjęłam liść z norki i okazało się, że część wierzchołkowa tkwi w głębi norki. Jeślibym nie widziała sposobu wciągania, zaliczyłabym liść do wciągniętych wierzchołkiem.

III. Dn. 6 X. 1929 r.

Godz. 8⁵⁰ wieczorem. Dałam dżdżownicy pasek z liścia lipy. Chwyta w kolejności liter na rys. 5. Dżdżownica porusza się ku nasadzie i przez pewien czas usiłuje liść przez zginanie wciągnąć. Pasek pokrywa norkę dżdżownica pracuje pod nim.

Godz. 9⁰⁰ wiecz. — Stale obmacuje przy nasadzie.

Godz. 9³⁰ wiecz. — Wysza nazewnątrz, robi ruchy kołowe. Dotknęła w punkcie K blaszki, przysssała się i ciągnie mocno. Chwyciła za L i liść wciągnęła do norki częścią wierzchołkową.

Wciąganie igieł sosnowych.

Para igieł, złączonych przy nasadzie, stanowi obiekt, który daje się łatwo wciągnąć jedynie przy uchwyceniu za nasadę, gdyż pochwylenie wierzchołka jednej igły spowoduje, iż druga stanie wpoprzek norki. To też w moich obserwacjach dżdżownice w 95.3% wciągają pary igieł za nasadę (czyli spojenie dwu igieł). Wychodząc z tego faktu, usiłowałam zbadać, jakie czynniki stanowią przyczynę tak znacznej przewagi nasady. Nasada igieł

składa się z trzech części: nazewnątrz są łuski, po ich usunięciu zostaje zgrubienie łączące obie igły (skrócony pęd), które łatwo odpada, poczem igły się rozdzielają, wreszcie na bazalnym końcu każdej igły zostaje małe rozszerzenie. Eksperymenty przeprowadzałam z parami igieł i z igłami pojedynczemi. Pojedyncze igły były brane chętnie przez dżdżownice, pomimo że pracowały duże osobniki *Lumbricus terrestris*, a te naogół rzadko biorą przedmioty drobne.

Wpływ części składowych nasady.

W celu zbadania wpływów chemicznych nasady należało wyłączyć wpływ oporu i kształtu. Dawałam dżdżownicom do wciągania igły związane przy wierzchołkach oraz igły pojedyncze. Pary igieł wiązywałam nitką tuż przy wierzchołkach, nitkę ucinałam jak najkrócej. W jednym doświadczeniu dawałam do wciągania igły, których nasady posiadały łuski, w drugim łuski przy nasadzie usuwałam starannie. Wynik wciągania przedstawia tabela VII.

Tabela VII.

Wciąganie par igieł sosnowych ze związanymi wierzchołkami.
Einziehen von Kiefernadeln mit zusammengebundenen Spitzen

Objekt wciągany <i>Objekt</i>	Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Wierzchołkiem <i>An der Spitze</i>	Nasadą <i>An der Basis</i>
Nasada z łuskami <i>Basis mit Schuppen</i>	147	22,5	77,5
Nasada bez łusek <i>Basis schuppenlos</i>	136	48,5	51,5

Widać z niej, że łuski wywierają wielki wpływ na sposób wciągania igieł, gdyż po ich usunięciu dżdżownica wciąga obydwie końce jednakowo często. Dzięki związaniu wierzchołków, różnica oporu została całkowicie wyrównana.



Rys. 6. Sposób związania dwu par igieł w celu wyeliminowania czynnika oporu i kształtu.

Fig. 6. Zwei zusammengebundene Nadelpaare werden an der beschuppten Basis eingezogen (Tab. VIII).

Aby dać możność wybierać dżdżownicom pomiędzy nasadą z łuskami a bez łusek, przy zachowaniu równości wszystkich

innych warunków, ucinałam wierzchołki dwu par igieł i związywałam je jak na rys. 6.

Na obu końcach symetrycznie ułożonej podwójnej pary igieł znajdowała się nasada. Nasadę jednego końca oczyszczałam z łusek, nasadę drugiego pozostawiałam bez zmiany. Zgrubienie, wywołane przez zwiążanie wierzchołków czterech igieł, było w środku obiektu i jedynie obydwie końce różniły się od siebie obecnością, względnie nieobecnością łusek. Wynik wciągania był następujący.

Tabela VIII.

Wciąganie związanych dwu par igieł.
Einziehen von zusammengebundenen zwei Nadelpaaren (Fig. 6).

Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Nasada z łuskami <i>Basis mit Schuppen</i>	Nasada bez łusek <i>Basis schuppenlos</i>
124	81.5	18.5

Niewątpliwie łuski zawierają jakiś czynnik, wybitnie wpływający na pracę dżdżownicy.

Ten sam wniosek wynika z doświadczeń z igłami pojedynczemi. Przecinałam nożyczkami nasadę w kierunku podłużnym, by oddzielić od siebie dwie igły. Na końcu bazalnym każdej

Tabela IX.

Wciąganie igieł pojedynczych.
Einziehen einzelner Nadeln.

Objekt wciągany <i>Objekt</i>	Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Wierzchołkiem <i>An der Spitze</i>	Nasadą <i>An der Basis</i>	Wpoprzek <i>In der querem Richtung</i>
Nasada z łuskami <i>Basis mit Schuppen</i>	105	22.9	75.2	1.9
Nasada bez łusek <i>Basis schuppenlos</i>	109	47.7	50.5	1.8
Nasada ucięta w odległości 2 mm <i>Ohne 2 mm Basis</i>	106	46.2	50.0	3.8
Nasada ucięta w odległości 1 cm <i>Ohne 1 cm Basis</i>	114	51.7	47.4	0.9

igły pozostawało pół nasady z łuskami. Igły takie preparowałam następnie w różny sposób. Częściowo podawałam je dżdżownicy z nietkniętą nasadą i łuskami, częściowo po oczyszczeniu z łusek lub po ucięciu koło 2 mm nasady lub wreszcie po usunięciu 1 cm igły ze strony nasady. Wynik doświadczenia podaje tabela IX.

Tabela wskazuje wyraźnie, że jedynie łuski wpływają na uprzywilejowanie nasady. W nieobecności łusek dżdżownica nie odróżnia obu końców igieł.

Najbardziej miarodajnym będzie wynik doświadczeń z wyciągiem żelatynowym z nasad igieł. Pary igieł suszyłam, ucinając wierzchołki na odległości 0.5 cm od końca. Tak samo postępowalam z nasadą z łuskami lub bez. Rozcierałam otrzymane kawałeczki na proszek. Brałam te same proporcje proszku i żelatyny, jak przy wyciągach z blaszki liściowej. Metoda pokrywania nia patyczków również była taka sama.

Tabela X.

Wciąganie patyczków, pokrytych proszkiem z poszczególnych części igieł.
Einziehen von mit zerriebenen Nadelteilen bedeckten Holzstäbchen.

Pochodzenie proszku <i>Provenienz des Pulvers</i>	Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Wierzchołkiem <i>An der Spitze</i>	Nasadą z łuską <i>Basis beschuppt</i>	Nasadą bez łuski <i>Basis ohne Schuppen</i>
Wierzchołki — nasada bez łusek <i>Spitzen — Basis schuppenlos</i>	78	47.4	—	52.6
Nasada bez łuski — nasada z łuską <i>Basis schuppenlos — Basis beschuppt</i>	75	—	80.0	20.0

Wynik doświadczenia (tabela X) potwierdza najzupełniej doniosłe znaczenie właściwości chemicznych łusek. Pod względem chemicznym dżdżownica nie odróżnia nasady igieł, pozbawionej łusek, od ich wierzchołków. Natomiast sproszkowane łuski działają wybitnie przyciągająco.

Wpływ oporu.

Że opór wywiera duży wpływ na wciąganie igieł, widać to stąd, że jeżeli damy dżdżownicom do wciągania sztuczne igły z dwóch cienkich słomek, związanych na jednym końcu na podobieństwo pary igieł sosnowych, to wciągają one w 67.6% za złączoną część słomek. Podwójne igły sosnowe z nasadą oczyszczoną z łusek wciągają w znacznej mierze za nasadę, pomimo że nasada bez łusek nie wywiera wpływu chemotropicznego dodatniego.

Możemy więc przyjąć, że przy wciąganiu igieł istnieją dwa czynniki, powodujące przewagę wciągnięć za nasadę: a) chemizm

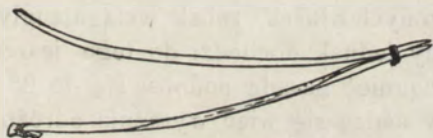
tkwiący w łuskach i b) wpływ oporu. Współdziałanie obu tych czynników wynika z doświadczenia wykonanego przez HANEL.

Tabela XI.

Wciąganie par igieł chemicznie jednorodnych.
Einziehen chemisch indifferenter Nadelpaaren.

Objekt wciągany <i>Objekt</i>	Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Nasadą <i>An der Basis</i>	Wierzchołkiem <i>An der Spitze</i>
Igły sztuczne ze słomy <i>Künstliche Nadeln aus Stroh</i>	71	67.6	32.4
Para igieł sosnowych (nasada bez łusek) <i>Kiefernadelpaare Basis schuppenlos</i>	133	63.2	36.8

Związywała ona wierzchołki pary igieł a następnie jedną igłę przecinała wpoprzek tuż przy nasadzie. Powstawała para igieł odwrotnych, jak to widać na rysunku 7. Nasadę tworzą związane wierzchołki, jedna z igieł jest zakończona nasadą z łuskami.



Rys. 7. Sposób związania dwu igieł w celu wykazania przeciwdziałania czynników oporu i chemizmu.

Fig. 7. Nadelpaar mit verkehrter Polarität. Vgl. Tab. XII.

W 56.6% przypadków dżdżownicy wciągały nową nasadę, czyli czynnik oporu przeważał nad chemizmem. Nowa nasada

Tabela XII.

Wciąganie par igieł związanych przy wierzchołku, nasada z łuską tkwi na końcu jednej igły.

Einziehen von Nadelpaaren mit zusammengebundenen Spitzen, Basis mit Schuppen bleibt am freien Ende einer Nadel (Fig. 7).

Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Wolny koniec z nasadą <i>Das freie Nadelende mit Basis</i>	Wolny koniec bez nasady <i>Das freie Ende ohne Basis</i>	Związane wierzchołki <i>Die zusammengebundenen Spitzen</i>
127	55.9	11.8	32.3

składała się z dwóch związanych ze sobą wierzchołkami igieł, w których wpływy chemotropiczne dodatkowo są nieobecne. A jednak robaki ciągnęły przeważnie za nową nasadę.

Mój wynik w tych samych warunkach był trochę inny, gdyż nieznaczna przewaga była po stronie nowego wierzchołka.

W tym przypadku wpływy chemiczne ze strony igieł i wpływ mechaniczny kształtu przeciwdziałają sobie. Natomiast porównanie wyniku wciągania igieł zwykłych i igieł, których nasady zostały oczyszczone z łusek, wskazuje, że oba te czynniki mogą współdziałać ze sobą.

Tabela XIII.

Wciąganie par igieł sosnowych.
Einziehen von Kiefernadelpaaren.

Objekt wciągany <i>Objekt</i>	Ilość wciągnięć <i>Gesamtzahl</i>	Nasada <i>An der Basis</i>	Wierzchołkiem <i>An der Spitze</i>
Nasada bez łusek <i>Basis ohne Schuppen</i>	133	63.2	36.8
Nasada z łuskami <i>Basis beschuppt</i>	278	95.3	4.7

Gdy grają rolę wyłącznie względy mechaniczne (igły o nasadach, oczyszczonych z łusek), robaki wciągają igły nasadą w 63.2% przypadków, gdy jednak dochodzi do tego jeszcze chemizm łusek, odsetek wciągnięć nasadą podnosi się do 95.3%. Obie kategorie czynników dadzą się więc wyraźnie odróżnić.

Uwagi ogólne.

Analiza czynników, wpływających na charakter pracy robaka przy wciąganiu do norki różnorodnych przedmiotów, nastrocza duże trudności teoretyczne. Zwłaszcza niejasne jest w tym przypadku pojęcie kształtu. Rozpoznajemy kształt przedmiotów wzrokowo lub też dotykowo. Gdy idzie o dotyk, który jedynie wchodzi w rachubę w przypadku dżdżownicy, niezbędnym warunkiem odróżnienia kształtu jest systematyczność i kolejność wrażeń. Ślepy doskonale odróżnia podany mu sześciąt od ośmiościanu, ale tylko pod warunkiem, że obydwie formy obmaca systematycznie, krawędź po krawędzi i wierzchołek po wierzchołku. Gdybyśmy mu pozwolili dotknąć przedmiotu końcem palca w 50 przypadkowo wybranych punktach, to otrzymane 50 wrażeń nigdy nie złożyłyby się na wrażenie kształtu całości przedmiotu. Pomijając zupełnie sprawę przeżyć dżdżownicy, zwrócimy się do

zbadania, czy w sposobie jej pracy są obecne warunki, które w naszym doświadczeniu niezbędnie poprzedzają rozpoznanie kształtu.

Obserwacje moje wykazały jasno, że dżdżownica nigdy nie obmacuje przedmiotów systematycznie. Zahaczony tylnym końcem o ścianki norki robak wyciąga przednią część ciała nazewnątrz i obmacuje przysawką gębową napotkane przedmioty. Skoro natrafi na coś ruchomego, przysysa się w pierwszym napotkanym punkcie i ciągnie, kurcząc się maksymalnie. Za jednym zamachem przedmiot nie może być całkowicie wciągnięty do norki, największy skurcz przedniej połowy ciała może doprowadzić otwór gębowy najwyżej do górnej części kanału norki, ale nie głębiej. Dlatego też, o ile przedmiot nie stanowi nadmiernego oporu, robak puszcza go, wyciąga się ponownie i chwyta przedmiot w punkcie bardziej odległym od otworu norki, poczem znowu kurczy się. W ten sposób, kawałek po kawałku, przedmiot zostaje wepchnięty do norki. Punkty przedmiotu, w których kolejno, przysysa się dżdżownica, są od siebie odległe nieraz o parę centymetrów, gdy punktów pośrednich robak wcale nie dotyka. Nie może tu być mowy o jakimkolwiek systematycznym obmacywaniu, jest tylko szereg oddzielnych, niezależnych od siebie chwytów, które nie mogą złożyć się na rozpoznanie kształtu całości. Liść, wciągany podobną metodą, pod względem kształtu miałby dla robaka najwyżej wartość cienkiego pręcika, który otrzymamy łącząc linjami prostymi kolejne punkty chwytu na powierzchni blaszki. W pracy robaka brak zupełnie warunków, poprzedzających wszelkie rozpoznanie kształtu.

Z drugiej strony domniemany czynnik kształtu często trudno jest odróżnić od czynnika oporu, bowiem przy wciąganiu przedmiotów obydwie są niezbędnie związane ze sobą. Gdyby jednak czynnik kształtu jako takiego odgrywał rolę w działaniach robaka, to przy wciąganiu przedmiotów dżdżownica koniecznie musiałaby wykonywać pewne ruchy, skierowane specjalnie li-tylko ku rozpoznaniu kształtu. Ewentualny związek kształtu z oporem musielibyśmy rozumieć jako rodzaj trwałego skojarzenia, dzięki któremu wrażenie otrzymane ze strony jednego ze składników wywołuje ruchy, związane z drugim składnikiem. Dżdżownica, wciągająca liść, wciąga go w kierunku mniejszego oporu, ale ten kierunek, czyli właściwe miejsce chwytu, robak musiałby roz-

poznać nie bezpośrednio z wielkości pokonywanego oporu, lecz z różnic kształtu liścia w poszczególnych jego punktach. Wówczas należy się spodziewać, że zwierzę będzie chwyciło liść w różnych punktach, ale zacznie go ciągnąć dopiero po natrafieniu na punkt właściwy, gdy inne punkty nie doprowadzą do tej reakcji. Tylko w tym przypadku mielibyśmy jasne odróżnienie czynnika kształtu od czynnika oporu. Jednak w rzeczywistości dżdżownica nigdy w ten sposób nie postępuje, bowiem każdy, przypadkowy chwyt stale powoduje natychmiastową próbę wciągnięcia. Dżdżownica nie czyni żadnych prób, skierowanych ku rozpoznaniu kształtu, ciągnąc zawsze „na ślepo“.

W wyniku, żadne fakty nie przemawiają za tem, aby kształt przedmiotów jako taki wpływał w czemkolwiek na pracę wciągania. W literaturze tylko DARWIN był zdania, iż dżdżownica powoduje się formą, nie dał jednak żadnej analizy tego pojęcia. HANEL usiłowała przeprowadzić taką analizę, sprowadzając rolę kształtu do określonej kolejności wrażeń kinestetycznych. Jednak jej pogląd całkowicie opiera się na systematyczności pracy robaka, który obmacuje kolejno tuż obok siebie położone punkty przedmiotu. Jak się okazało później, i jak wynika również jasno z moich obserwacji, założenie to nie jest słuszne, wobec czego musi upaść i sama teoria. Czynnikiem kształtu, jako przyczynę, wpływającą na sposób pracy robaka przy wciąganiu przedmiotów do norki, możemy z wszelką pewnością wyeliminować.

Czynnik oporu bezsprzecznie odgrywa bardzo ważną rolę w zachowaniu się dżdżownicy. Ale i tu musimy zrobić pewne zastrzeżenia. Należy ściśle odróżnić wpływ oporu na zachowanie się robaka od wpływu oporu na ostateczny wynik procesu wciągania. Jak już podnosiłam poprzednio, dopiero zaczynając od pewnej minimalnej absolutnej wielkości oporu robaki zaczynają reagować na jego lokalne różnice. Twierdzenie, iż robak wyszukuje kierunek najmniejszego oporu, kryje w sobie dwuznacznik. Jeśli robak ciągnie liść, który oparł się grubym nerwem środkowym o brzegi norki, uniemożliwiając wciągnięcie, i jeśli puszcza go po chwili, aby pochwycić w innym punkcie, to niema w tem właściwego wyszukiwania, niema momentu wyboru. Prostu liść zostanie wciągnięty w tym kierunku, który umożliwi jego wciągnięcie. W przypadku istnienia prawdziwego wyboru, robak powinien czynić próby oceny wielkości oporu, musi istnieć ścisły

związek pomiędzy metodą pracy dżdżownicy a wielkością napotkanego w każdym poszczególnym punkcie liścia oporu. Młody, wiotki liść lipy może być wciągnięty w każdym dowolnym kierunku i istotnie niema przy wciąganiu żadnej wyraźnej przewagi jakiegokolwiek jego okolicy. Podobnie kółka, wycięte z wierzchołkowej części blaszki liściowej, zostają wciągnięte jednakowo często za każdy punkt obwodu. Nie mniej, wielkość oporu tych przedmiotów w różnych kierunkach jest bardzo niejednakowa. Dżdżownica bynajmniej nie wyszukuje kierunku najmniejszego oporu, ciągnąc z tą samą siłą za każdy przypadkowo napotkany punkt liścia. Zmiana chwytów nigdy nie występuje systematycznie w kierunku oporu malejącego. Ścisłej więc będzie powiedzieć, że w pracy swej robak wyszukuje jedynie kierunek oporu, możliwego do przez wyciężenia. Natomiast pomiędzy różnymi wielkościami takich możliwych oporów nie robi żadnej różnicy. Pojęcie wyboru i wyszukiwania ma tu znaczenie czysto mechaniczne: sposób pracy dżdżownicy nie zależy od wielkości napotkanego oporu, natomiast zależy od niej bezpośrednio wynik wciągania. Opór blaszki liściowej maleje ku wierzchołkowi, więc w tym samym kierunku wzrasta stopień możliwości wciągnięcia. Dlatego tylko większość liści zostaje wciągnięta za wierzchołek.

Bardziej zawily jest czynnik lokalnych różnic chemicznych. Podane liście całkowite dżdżownica w olbrzymiej większości przypadków wciąga za blaszkę, i tylko bardzo rzadko za ogonek. Za pomocą metody patyczków drewnianych, pokrytych mieszaniną żelatyny ze sproszkowanymi różnymi częściami liścia, ustaliłam, że ogonek liściowy o wiele słabiej przyciąga robaka, niż blaszka. Różnica jakichś właściwości chemicznych blaszki i ogonka idzie w parze z różnicą kierunku wciągania. Jednakże ten czynnik chemiczno-dotykowy z pewnością nie jest sam w sobie wystarczającym tłumaczeniem. Raczej właściwości chemiczno-dotykowe blaszki liściowej, względnie ogonka, stanowią tylko środek rozpoznawczy, gdy właściwym powodem przewagi wciągnięć za blaszkę jest ta okoliczność, że blaszka może służyć robakowi jako pokarm. Wciągnięte do norki liście dżdżownica najczęściej obgryza, pozostawiając tylko nerw główny z ogonkiem oraz twarde, bliżej nasady liścia leżące nerwy boczne. Przypuszczenie DARWINA, że dżdżownice wciągają do norki różne przedmioty w celu zabezpieczenia się od zimna, nie jest wcale

prawdopodobne. Robak pracuje w ciągu nocy, gdy temperatura jest niska, i wysuwa się wtedy prawie całkowicie z norki. Zatkanie zaś wylotu norki mogłoby chronić robaka przed zimnem tylko podczas dnia, gdy właśnie temperatura jest wyższa. Nie mniej nieprawdopodobna jest hipoteza, iż robaki przez zatykanie nerek utrudniają swoim wrogom dostęp do nich. Nagromadzone nad każdą norką kupy opadłych liści wskazują różnym ptakom, gdzie mają szukać dżdżownic. Ptaki doskonale też potrafią systematycznie rozgrzebywać kopce liściowe i wyciągać z nerek robaki. Najwięcej faktów przemawia za tem, że dżdżownice po prostu nagromadzają zapasy pożywienia. Różnorodne części roślinne, zbyt twarde dla bezpośredniego zużytkowania, pozostając przez pewien czas w głębi zawsze wilgotnej norki, ulegają gniciu. Dzięki temu mogą powstać dookoła nich skupienia bakteryj, które robak polyka wraz z ziemią. Tem tłumaczę intensywne wciąganie przez dżdżownicę igieł sosnowych, które nie mogą być bezpośrednio użyte jako pokarm.

Wobec powyższego blaszka liściowa różni się od ogonka nie tylko pod względem chemiczno-dotykowym, ale jeszcze i tem, że blaszka dostarcza dżdżownicy pożywienia, gdy ogonek nadaje się do tego w daleko mniejszym stopniu. Natrafiając przy poszukiwaniach dookoła norki na cienki i twarde ogonek liściowy, zwierzę chwytą go raz i drugi, ale wypuszcza wkrótce, nieraz nie próbując ciągnąć, natomiast dotknięcie blaszki liściowej stale powoduje maksymalny skurcz robaka.

W obrębie samej blaszki lokalnych różnic chemizmu dżdżownica nie rozpoznaje. Wynik doświadczeń z patyczkami drewnianymi i zwłaszcza z paskami, wyciętymi z liścia lipy równoległe do nerwu głównego, wyraźnie tego dowodzi. Wycinki podłużne z liści sięgały z jednego końca wierzchołka liściowego, z drugiego jego nasady. Po przybliżonem zrównaniu oporów (ścinałam nerw główny) nie było przewagi wciągnięć na żadnym końcu, czyli ewentualna różnica właściwości chemicznych nasady, względnie wierzchołka liścia, która właśnie w tych warunkach powinna była wystąpić, wcale nie ujawniła się w zachowaniu się robaka.

Właściwości chemizmu igieł przy ich nasadzie stanowią czynnik bardzo ważny, gdy idzie o kierunek wciągania. Jak widzieliśmy, decyduje tu obecność lub nieobecność łusek, które za-

wierają jakiś czynnik chemicznie dodatni. Jednocześnie, wciągając złączoną parę igieł za ich wspólną nasadę, dżdżownica ma do przewyciężenia mniejszy opór. Oba te czynniki, w zwykłym doświadczeniu robaka stale skojarzone ze sobą, udaje się eksperymentalnie rozdzielić. W doświadczeniu z parą igieł, związanych przy wierzchołku i rozdzielonych przy nasadzie, dżdżownice w 55.9% przypadków chwyciły za wolny koniec igły ze znajdującą się na nim nasadą (rys. 7), jakkolwiek miały w tym przypadku do przewyciężenia większy opór. Widzimy tu wyraźną rywalizację obu czynników, które przy nasadzie zwykłych par igieł ulegają sumowaniu. Robak nie pracuje czysto mechanicznie, ciągnąc na ślepo za każdy przypadkowo napotkany punkt igieł, lecz w pewnej mierze kieruje się właściwościami chemicznymi przedmiotu, które mogą okazać się niezgodne z jego cechami mechanicznymi.

Nie przeprowadzałam specjalnych doświadczeń w celu sprawdzenia, czy dżdżownice mogą tworzyć skojarzenia pamięciowe (MALEK '27). Posiadam jednak w tej mierze pewne obserwacje. Podczas doświadczeń masowych robaki wciągają za każdym razem bardzo różną ilość przedmiotów. Igły sosnowe są przez jakiś czas wciągane bardzo intensywnie, jednakże po kilku dniach liczba igieł wciągniętych zmniejsza się bardzo znacznie. Zjawiska tego nie zauważyłam przy wciąganiu liści, natomiast najwyraźniej występuje ono przy wciąganiu patyczków. Jeśli obok igieł, które dżdżownice wciągają już w małej ilości, dać liście, to wzmaga się także i intensywność wciągania igieł. Zjawisko to żywo przypomina fakty hamowania i odhamowywania odruchów w doświadczeniach PAWŁOWA. Igieł, które przez długi czas leżały koło nerek, dżdżownice nie wciągały wcale. Natomiast po rozsypaniu na gazonie nowych igieł stwierdzałam następnego dnia, że duża ich ilość została wciągnięta. Zgodnie z hipotezą MALEKA, dżdżownice nie powracają do przedmiotów, które już raz próbowały wciągnąć i które prawdopodobnie poznają po pozostałym na nich śluzie. W każdym razie robaki po pewnym czasie zaczynają omijać przedmioty dla nich bezużyteczne jako pokarm. Wszystko to wskazuje na zdolność tworzenia skojarzeń i pewien stopień plastyczności zachowania się. Jednak w tej dziedzinie decydowałyby specjalnie w tym celu przeprowadzone obserwacje.

Streszczenie.

1°. Przy wciąganiu przez dżdżownicę liści rozmaitych gatunków drzew przeważna ilość liści zostaje wciągnięta wierzchołkiem.

2°. Usunięcie ogonka liściowego nie wpływa na wynik wciągania.

3°. Metoda pokrywania patyczków drewnianych mieszaniną żelatyny ze sproszkowanymi różnymi częściami liścia wykazała różnicę wpływu dodatnio-chemotropicznego blaszki i ogonka na korzyść blaszki.

4°. W obrębie samej blaszki lokalnych różnic chemicznych dżdżownica nie rozpoznaje.

5°. Próby z trójkątami papierowymi nie udały się, musiano zastąpić papier wycinkami z blaszki liściowej.

6°. Wciąganie wycinków z liści lipy w kształcie trójkątów równobocznych i równoramiennych wykazały, że robak nie powoduje się kształtem przedmiotu wciąganego. Jedynie opór, niejednakowy przy każdym kącie wycinka, decyduje o wyniku wciągania.

7°. Wciąganie wycinków w kształcie liści lipy, ale o odwróconej bieguności również wykazuje, że dżdżownica nie kieruje się przy wciąganiu kształtem przedmiotu.

8°. Jak wynika z bezpośredniej obserwacji pracy dżdżownic, chwytają one za pierwsze napotkane miejsce przedmiotu; systematycznie przedmiotu robaki nie obmacują.

9°. Doświadczenie z liśćmi wierzby, z młodeymi liśćmi lipy oraz z paskami wyciętymi z liści lipy wzdłuż nerwu głównego wykazały, że jedynie opór wpływa na końcowy wynik pracy dżdżownicy. Pasek o mniej więcej jednakowym oporze, uzyskanym przez ścięcie nerwu głównego przy nasadzie, jest jednakowo często wciągany za obydwa końce.

10°. Krażki wycięte z liści lipy (przy wyeliminowaniu różnic chemizmu, kształtu i oporu) są wciągane jednakowo często za każdy punkt obwodu.

11°. W pracy dżdżownicy niema prawidłowości i działania celowego.

12°. Igły sosnowe są w przeważającej liczbie przypadków wciągane za nasadę.

13°. Doświadczenia, w których wyłączono wpływ kształtu i oporu wykazały, że istnieje przy nasadzie igieł pewien czynnik chemicznie dodatni dla dżdżownicy. Czynnik ten mieści się wyłącznie w łuskach nasady.

14°. Sztuczne pary igieł ze słomy zostają wciągnięte poważnie za nasadę.

15°. Przy wciąganiu odwróconej pary igieł (wierzchołki związane tworzą nasadę, nasada z łuską jest na wolnym końcu jednej igły) zachodzi przeciwdziałanie dwu czynników — oporu i chemizmu.

16°. Przy wciąganiu zwykłych par igieł z nasadą pokrytą łuskami czynniki oporu i chemizmu sumują się, powodując prawie wyłącznie wciąganie za nasadę.

17°. Wciągając rozmaite przedmioty do norki, dżdżownice gromadzą pożywienie.

18°. Przewaga wciągnięć blaszki w stosunku do wciągnięć ogonka tłumaczy się tem, że miękka blaszka może służyć robakowi jako pokarm.

19°. Igły sosnowe, pozostając w głębi wilgotnej norki ulegają gniciu i prawdopodobnie powodują skupienie bakterij, połączonych wraz z ziemią przez robaki.

20°. Luźne spostrzeżenia zdają się potwierdzać hipotezę MALEKA, że dżdżownice są zdolne do tworzenia skojarzeń i wykazują pewien stopień plastyczności zachowania się.

Piśmiennictwo.

Darwin Ch. 1881. Die Bildung der Ackererde durch die Tätigkeit der Würmer. Ges. Werke. Stuttgart. Hanel E. 1904. Ein Beitrag zur „Psychologie“ der Regenwürmer. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4 (244). Heck L. 1920. Über die Bildung einer Assoziation beim Regenwurm auf Grund von Dressurversuchen. Lotos 67 (168). Jennings H. S. 1910. Das Verhalten der niederen Organismen. Übers. v. E. Mangold. Jordan H. 1913. Wie ziehen Regenwürmer Blätter in ihre Röhren. Zool. Jahrb. Abt. f. allgem. Zool. u. Physiol. 33 (95). Mangold O. 1925. Beobachtungen und Experimente zur Biologie des Regenwurms. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 2 (57). Malek R. 1927. Assoziatives Gedächtnis bei den Regenwürmern. Biologia Generalis. 3 (317). Yerkes R. M. 1912. The intelligence of the earthworms. Journ. of anim. Behavior. 2 (332).

RECHERCHES SUR LA PERMÉABILITÉ DES MEMBRANES ET SUR LA PRESSION OSMOTIQUE DES ŒUFS DES SALMONIDES

Par **M. BOGUCKI**

(Laboratoire de Physiologie de l'Institut Nencki à Varsovie)

Avec 4 figures dans le texte

Reçu le 12 septembre 1929

Grâce aux recherches d'ATKINS ('09), de BACKMANN et RUNNSTRÖM ('09, '12), de BIAŁASZEWICZ ('12) et de PRZYŁĘCKI ('17, '18, '21) on sait aujourd'hui, que la pression osmotique des œufs fécondés, dont le développement se produit dans l'eau douce est sensiblement inférieure à celle des œufs ovariens, la pression osmotique de ces derniers se rapprochant à celle du sang. La diminution de la pression osmotique a lieu également — selon PRZYŁĘCKI — dans les œufs vierges mis dans l'eau.

Toutefois la pression osmotique des œufs, bien que diminuant après la fécondation, reste toujours supérieure à celle du milieu aquatique.

A l'état actuel de nos connaissances il est impossible de fixer les causes effectives de l'abaissement de la dite pression dans les œufs: y avons-nous à faire exclusivement avec l'absorption d'eau par l'œuf, ou bien avec l'élimination des substances osmotiques en dehors de l'œuf, ou peut-être avec les suites de l'adsorption des électrolytes par le plasma ovulaire, comme le croient BACKMANN et RUNNSTRÖM.

Nous ne sommes pas, non plus, en possession de données sûres et certaines au sujet des causes qui maintiennent la différence entre la pression osmotique des œufs et celle du milieu.

Les résultats des recherches des auteurs mentionnés nous démontrent que l'abaissement de la pression osmotique, se produisant dans les œufs des animaux d'eau douce est un phénomène général à tel point qu'on peut le rencontrer chez les représentants des groupes aussi différents au point de vue de leur organisation que le sont les Crustacés, les Amphibiens et les Oiseaux.

Les recherches de GRAY ('20) et de RUNNSTRÖM ('20) sur la pression osmotique des œufs des Poissons n'ont pas donné de résultats suffisamment décisifs. D'après RUNNSTRÖM, dans les œufs fécondés du *Salmo salvelinus* la pression osmotique baisse (7% env.) par rapport à celle des œufs non fécondés, par contre, conformément aux résultats obtenus par GRAY qui a fait ses expériences sur les œufs du *Salmo fario*, il n'y a aucune différence entre la pression osmotique des œufs fécondés et celle des œufs non fécondés. Les résultats contradictoires de ces deux auteurs ne nous paraissent pas être suffisants à décider, si les œufs des poissons se distinguent — contrairement à ceux des autres animaux d'eau douce — par l'invariabilité de la pression osmotique, ainsi que l'admet HÖBER ('26)¹⁾ d'autant plus que les résultats obtenus par GRAY et qui ont servi de base à l'opinion de HÖBER prêtent à quelques doutes.

Les recherches qui sont l'objet du présent mémoire ont été entreprises dans le but de compléter nos connaissances concernant les propriétés osmotiques de l'œuf des Salmonides.

Ces recherches portent sur les points suivants:

1. la perméabilité de la membrane de l'œuf,
2. l'absorption de l'eau par l'œuf,
3. la formation du périvitellin,
4. la pression osmotique des œufs avant et après le transfert dans l'eau.

Pour éviter tout malentendu possible je tiens à signaler, que dans la suite la dénomination « œuf » comprendra la cellule ovulaire avec le périvitellin et la membrane externe par opposition à la cellule ovulaire seule.

Matériel et méthode

J'ai employé pour mes recherches les œufs de la Truite (*Salmo fontinalis* MIT. et *Salmo irideus* GIB.) et du Saumon (*Salmo salar* L.).

Pour examiner la perméabilité des membranes j'ai employé des dialysateurs, construits au moyen de la membrane de l'œuf, fixée sur

¹⁾ HÖBER R., *Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe*. VI Aufl., S. 347. „Die Senkung des osmotischen Druckes bei der Befruchtung ist aber keineswegs eine allgemein verbreitete Erscheinung. GRAY zeigte für Forelleneier, RUNNSTRÖM für Lachseier, die beide in Süßwasser ihre Entwicklung durchmachen, daß der Druck sich fast nicht ändert, bzw. daß keine Elektrolyte aus dem Innern austreten“.

un tube de verre à diamètre approprié. Ces dialysateurs contenant la solution de la substance examinée étaient plongés dans des éprouvettes remplies d'eau distillée.

Les soins ont été pris pour que la différence entre les niveaux des deux liquides (dans le dialysateur et dans l'éprouvette) ne dépasse pas 1 centimètre et que la membrane du dialysateur ne touche pas le fond de l'éprouvette. Au cours de l'expérience les éprouvettes avec les dialysateurs se trouvaient placées dans la chambre humide à la température de 16—20° C.

La quantité de la substance dialysée au cours de l'expérience était déterminée par la méthode de WHITEHORN ('21) — pour les chlorures et par celle de MICHAELIS ('14) — pour la glucose.

Pour l'étude de la perméabilité des membranes on a employé exclusivement les membranes des œufs qui ont séjourné quelque temps dans l'eau, les membranes des œufs « secs » c'est-à-dire pris de la cavité du corps, étant tellement fragiles qu'elles étaient coupées par le fil au moment, où on les fixait sur le tube de verre.

La pression osmotique était mesurée par la méthode cryoscopique.

Modifications des propriétés des membranes des œufs mis dans l'eau

Les membranes des œufs pris de la cavité du corps (les membranes des œufs « secs ») sont très fragiles, flexibles et transparentes mais deviennent, par contre, opaques et fortement élastiques après le transfert des œufs dans l'eau. Les membranes isolées des œufs « secs », après avoir été comprimées par la pression, ne reprennent plus leur forme sphérique. Les membranes des œufs « humides » (c. à d. placés dans l'eau) reprennent dans les mêmes conditions leur forme sphérique immédiatement après que la pression ait cessé d'agir.

Les membranes des œufs « secs » sont facilement détruites par l'action du NaOH. Dans la solution du NaOH à 1% les œufs se gonflent et les membranes se fendent après 30 minutes env., de sorte que leur contenu jaillit en dehors. Dans les mêmes conditions, les membranes des œufs « humides » restent intactes pendant des jours entiers, bien que le volume des œufs augmente considérablement (tabl. 1).

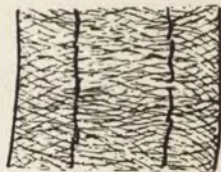


Fig. 1. Section transversale de la membrane ovulaire de la Truite.

Tableau I

Variations du volume de l'œuf dans les solutions du NaOH

NaOH %	Volume d'un œuf en cm ³ après							
	initial	4.5 heures	6.5 heures	9.5 heures	21.5 heures	29 heures	46 heures	60 heures
2	0.06	0.13	0.16	0.18	0.29	0.31	0.39	—
1.5	0.06	0.13	0.16	0.20	0.25	0.34	0.36	—
1	0.06	0.13	0.15	0.17	0.22	0.25	0.28	0.28
0.5	0.06	0.14	0.15	0.15	0.15	0.13	0.10	—

L'épaisseur des membranes des œufs « secs » et « humides » était mesurée sur les coupes des œufs gelés et était dans les deux cas de 90 micrones environ. La fig. 1 nous démontre la structure fibrillaire des membranes.

Perméabilité des membranes

En appliquant pour les mesurages de la diffusion à travers les membranes la méthode indiquée dans la partie méthodique (page 346), j'ai constaté que les membranes de la Truite et celles du Saumon sont perméables aux cristalloïdes examinés au cours de mes expériences: 1^o chlorures du Na, K et Ca, 2^o glucose et lactose, 3^o acides aminés (glycocol, fenylalanine, leucine), 4^o matières colorantes — crystal- violette, éosine, auramine.

Dans les expériences, dont la durée ne dépassait pas 20 heures, toutes ces substances se retrouvaient dans l'eau dans laquelle les dialysateurs avaient été plongés.

Par contre, les membranes se sont montrées imperméables aux colloïdes (l'amidon, le blanc d'œuf, le rouge Congo) dans les expériences de 30—40 heures. Cette imperméabilité n'est pas d'ailleurs absolue: dans l'expérience de la durée de 7 jours on a constaté que le rouge Congo passe par la membrane, mais vu la quantité minime de cette substance dialysée, il n'a point été possible de la déterminer quantitativement.

Les faits exposés ci-dessus prouvent que les membranes des œufs de la Truite et du Saumon sont facilement perméables aux cristalloïdes et difficilement aux colloïdes.

Afin de s'assurer, si la perméabilité des membranes est égale dans les deux sens, on a entrepris deux séries d'expériences: dans la première série les membranes ont été fixées sur les tubes de verre dans leur

position normale, c'est-à-dire la surface externe tournée au dehors, dans la deuxième les membranes étaient renversées, c.à.d. leur surface interne tournée au dehors.

Les chiffres du tableau II prouvent que la perméabilité des membranes aux chlorures (KCl, NaCl) et à la glucose est identique dans les deux sens.

Tableau II

Diffusion du KCl, du NaCl et de la glucose à travers les membranes

Espèce	<i>Salmo fontinalis</i>			<i>Salmo salar</i>		
	Durée de l'expérience h	Quantité de substance dialysée en %	Moyenne	Durée de l'expérience h	Quantité de substance dialysée en %	Moyenne
Dans le dialysateur: } KCl — 0,5 cm ³ (= 4.98 mg)	64	41	41	16	40	42
	64	37		16	41	
	64	46		16	45	
	64	55*		16	30*	
Dans l'éprouvette: } 1 cm ³ d'eau	64	39*	49	16	52*	42
	64	52*		16	46*	
	64	37		16	40	
	64	45		16	57	
Dans le dialysateur: } NaCl — 0,5 cm ³ (= 3.85 mg)	64	49	46	16	37*	43
	64	54		16	50*	
	64	54*		—	—	
	64	51*		—	—	
Dans l'éprouvette: } 1 cm ³ d'eau	64	51*	49	—	—	—
	64	51*		—	—	
	64	40*		—	—	
	64	18		—	—	
Dans le dialysateur: } glucose — 0,5 cm ³ (= 2.54 mg)	18	16	19	—	—	—
	18	19		—	—	
	18	20		—	—	
	18	16		—	—	
	18	23		—	—	
	18	23*		—	—	
Dans l'éprouvette: } 1,5 cm ³ d'eau	18	19*	20	—	—	—
	18	19*		—	—	
	18	19*		—	—	
	18	20*		—	—	

* Dans les expériences marquées par un asterisque les membranes étaient renversées c'est-à-dire mises avec leur surface intérieure à l'extérieur.

La comparaison de la diffusion du KCl à travers les membranes provenant des œufs qui ont été dans les différents stades du développement (tableau III) prouve que la perméabilité des membranes ne varie pas d'une façon appréciable au cours du développement: en effet, les membranes des œufs dont le développement se poursuivait pendant 10 jours laissent passer la même quantité de KCl que celles des embryons avancés (2 jours avant l'éclosion).

Tableau III

*Diffusion du KCl à travers les membranes des embryons de Truites.
Durée de l'expérience 16 heures*

Age de l'embryon	10 jours	2 jours avant l'éclosion
Genre de l'expérience	Quantité dialysée de KCl en ‰ de la quantité initiale	
Dans le dialysateur: $\left\{ \begin{array}{l} 0.5 \text{ cm}^3 \text{ KCl} \\ (= 3.73 \text{ mg}) \end{array} \right.$	N° 1 26	N° 1 12
	N° 2 30	N° 2 31
	N° 3 30	N° 3 16
	N° 4 21	N° 4 26
	N° 5 26	N° 5 22
	N° 6 32	N° 6 29
	N° 7 26	
Dans l'éprouvette: 1 cm ³ d'eau	N° 8 33	
	N° 9 25	
	N° 10 33	
moyenne	28‰	23‰

Absorption de l'eau

Mis dans l'eau, les œufs examinés des poissons en absorbent une quantité notable en augmentant leur volume. L'augmentation du volume est accompagnée d'une turgescence croissante.

La quantité de l'eau absorbée par l'œuf était mesurée de deux façons: par la méthode volumétrique et par la méthode gravimétrique.

Dans le dernier cas on a pesé les œufs avant de les transporter dans l'eau et dans des intervalles choisis pendant leur séjour dans l'eau. Avant de peser les œufs, on les séchait chaque fois avec du papier buvard.

Dans le premier cas (méthode volumétrique) on a mesuré les diamètres horizontal et vertical des œufs à des moments divers de leur

séjour dans l'eau, en en calculant le volume suivant la formule $V = \frac{4}{3} \pi ab^2$, où a correspond à la moitié du diamètre vertical et b — à la moitié du diamètre horizontal.

Le tableau IV nous démontre que les volumes des œufs calculés suivant la longueur de leurs trois axes ne diffèrent que très peu de ceux calculés suivant la longueur de leurs 2 axes. Dans ce tableau on a indiqué les volumes des œufs calculés d'après la longueur de leurs 2 diamètres (diamètre vertical et diamètre horizontal) et exprimés en unités relatives en admettant que les volumes calculés d'après la longueur de 3 axes sont égaux à 100.

Tableau IV

Volume des œufs calculé d'après les longueurs de 2 axes et exprimé en unités relatives. Volume calculé d'après les longueurs des 3 axes = 100.

N° 1 100	N° 4 99	N° 7 103	N° 10 107
N° 2 100	N° 5 100	N° 8 106	N° 11 107
N° 3 99	N° 6 103	N° 9 106	N° 12 102

Le tableau V indique les variations du poids des œufs exprimées en pourcentage de leur poids initial. Conformément aux chiffres présentés dans ce tableau on voit qu'en ce qui concerne l'absorption de l'eau, les œufs fécondés et les œufs vierges se comportent de la même manière. Le poids des œufs vierges aussi bien que de ceux fécondés augmente dans les mêmes limites.

Tableau V

Augmentation du poids des œufs de Truites, placés dans l'eau, en % du poids initial

Durée du séjour dans l'eau	40 minutes	55 minutes	90 minutes	2 heures	3 heures	6 heures	16 heures	17 heures	18 heures	38 heures	43 heures	74 heures	264 heures
N° 1	—	—	—	19	—	—	—	—	18	—	19	19	22
N° 2	10	—	—	—	—	12	—	—	—	—	—	—	—
N° 3	—	18	—	—	—	—	—	18	—	20	—	—	—
N° 4	—	—	—	—	10	—	9	—	—	—	—	—	—
N° 5*	—	—	18	—	—	—	—	—	17	—	—	—	—

* Le mesurage N° 5 se rapporte aux œufs fécondés, les autres — aux œufs vierges.

En présence de ces résultats j'ai fait des mesurages relatifs aux variations du volume sur les œufs vierges exclusivement.

Les chiffres indiqués au tableau V nous prouvent en outre, que la quantité de l'eau absorbée par les œufs provenant de femelles différentes varie dans les limites assez vastes de 10 à 20% du poids initial, et enfin, que l'eau est absorbée par l'œuf, principalement au premier temps du séjour dans l'eau.

En tenant compte du fait que le volume spécifique de l'ooplasmе de la Truite est égal à 0,92 (BIAŁASZEWICZ '26) nous obtiendrons la

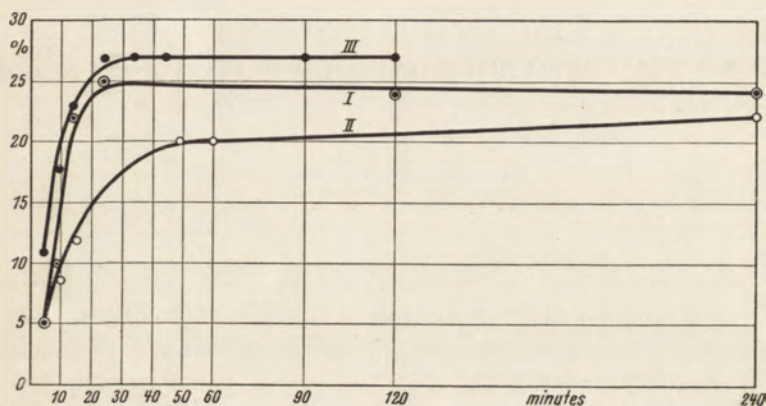


Fig. 2. Courbes de l'augmentation du volume des œufs exprimée en pour-cent de leur volume initial: I — dans l'eau (d'après le tabl. VI, No. 8), II — dans la glucose de 0,7 M (d'après le tabl. XI a, No. 2), III — dans l'urée de 0,8 M (d'après le tabl. XI b, Nr. 1).

quantité de l'eau absorbée par l'œuf qui correspond à 11—22% du volume initial de l'œuf.

La marche du processus de l'absorption de l'eau par les œufs de Truite ressort plus nettement des données du tableau VI. On y voit que la période de l'absorption la plus intense a lieu dans les premières 15 minutes du séjour des œufs dans l'eau. Pendant cette période l'œuf absorbe $\frac{3}{4}$ environ de la quantité de l'eau nécessaire à établir le nouvel équilibre entre l'œuf et le milieu ambiant. Ce fait nous est démontré par la courbe I de la fig. 2, tracée suivant les résultats de l'expérience No. 8 (tableau VI). Dans cette expérience le volume de l'œuf augmente après deux heures de séjour dans l'eau de 24% de sa valeur initiale et se maintient au cours de plusieurs heures sur le même niveau.

Tableau VI

Augmentation du volume des œufs de Truites dans l'eau en % du volume initial

Durée du séjour dans l'eau	5 minutes	10 minutes	15 minutes	20 minutes	25 minutes	120 minutes	240 minutes	15 heures
N° 1	8	11	—	17	—	—	—	—
N° 2	8	12	—	15	—	—	—	—
N° 3	12	15	—	15	—	—	—	—
N° 4	14	15	—	21	—	—	—	—
N° 5	3	11	—	12	—	—	—	—
N° 6	8	13	15	18	—	—	25	—
N° 7	21	24	27	28	—	—	30	—
N° 8	5	10	22	—	25	24	24	24
N° 9	5	15	15	—	19	22	22	19
N° 10	4	6	8	—	12	14	14	11
N° 11	5	16	16	—	17	21	21	—

Par la méthode gravimétrique on a obtenu des valeurs un peu inférieures aux valeurs effectives, vu qu'il a été impossible de sécher les œufs avant le premier pesage avec autant de précision qu'avant les pesages suivants, lorsque les membranes ont acquis une résistance suffisante.

Ainsi à base des données ci-dessus nous pouvons admettre que l'œuf placé dans l'eau en absorbe une quantité correspondant à 20% env. de son volume initial.

Formation du périvitellin

Le processus de l'absorption de l'eau est en rapport intime avec la formation du périvitellin. Dans l'œuf « sec » la surface de la cellule ovulaire se trouve en contact immédiat avec la membrane. Mis dans l'eau, l'œuf augmente son volume tandis que le volume de la cellule ovulaire diminue légèrement. Ainsi, il se forme entre la cellule ovulaire et la membrane un espace périvitellinaire, qui augmente au fur et à mesure de l'absorption de l'eau par l'œuf.

Le périvitellin atteint le maximum de son volume en même temps que l'œuf (tabl. VI et VII, fig. 2 et 3).

Tableau VII

Volume du périvitellin de l'œuf placé dans l'eau, en % du volume initial de celui-ci

Durée du séjour dans l'eau	5 minutes	10 minutes	15 minutes	20 minutes	24 minutes	30 minutes	120 minutes	240 minutes	15 heures
N° 1	5	12	—	15	—	—	—	—	—
N° 2	4	12	—	16	—	—	—	—	—
N° 3	6	7	—	12	—	—	—	—	—
N° 4	8	12	—	16	—	—	—	—	—
N° 5	8	12	—	14	—	—	—	—	—
N° 6	2	11	15	14	—	16	—	15	—
N° 7	11	17	20	17	—	17	—	20	—
N° 8	9	12	17	—	18	—	23	23	23
N° 9	12	17	18	—	17	—	23	23	24
N° 10	12	15	17	—	18	—	23	19	21
N° 11	8	12	12	—	14	—	18	18	—

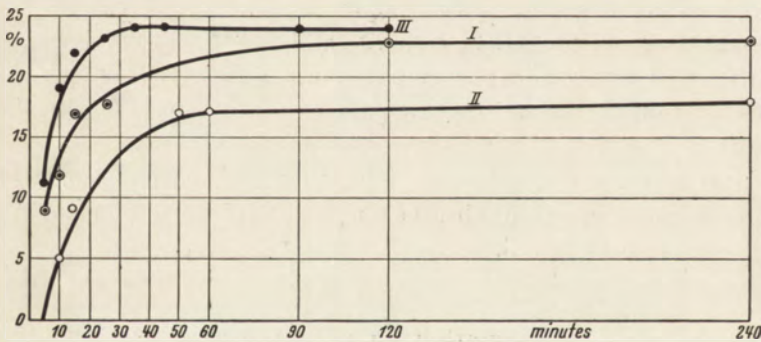


Fig. 3. Courbes du volume du périvitellin exprimé en pour-cent du volume initial de l'œuf: I — dans l'eau (tabl. VII, No. 8), II — dans la gluucose de 0.7 M (tabl. XIIa, No. 2), III — dans l'urée de 0.8 M (tabl. XIIb, No. 1).

Le volume du périvitellin a été calculé à base de la différence entre le volume de l'œuf et celui de la cellule ovulaire, en tenant compte du volume de la membrane. Ce dernier a été déterminé par le volume total de l'œuf « sec », déduction faite du volume de la cellule ovulaire.

Dans le tableau VIII on trouve indiquées les variations du volume des cellules ovulaires au cours des quatre premières heures du séjour

des œufs dans l'eau. On y constate que le volume de la cellule diminue aux premiers moments d'une façon plus ou moins sensible, tandis que l'œuf augmente son volume d'une façon continue.

Tableau VIII

Variations du volume de la cellule ovulaire dans l'eau (unités relatives)

Durée du séjour dans l'eau	0 minutes	3 minutes	5 minutes	10 minutes	15 minutes	20 minutes	25 minutes	30 minutes	120 minutes	240 minutes
N° 6	100	106	—	101	99	102	—	107	—	109
N° 7	100	109	—	106	105	109	—	109	—	109
N° 8	100	—	96	97	104	—	106	—	99	99
N° 9	100	—	93	97	95	—	98	—	97	97
N° 10	100	—	91	90	91	—	93	—	89	93
N° 11	100	—	95	103	103	—	103	—	102	102

Nous nous trouvons donc en présence du phénomène déjà observé par PRZYŁĘCKI ('17 et '18) sur les œufs fécondés et les œufs vierges de la grenouille. La diminution du volume de la cellule ovulaire au moment de la formation du périvitellin fut également signalée chez Petro-myzon (PIRLOT '25) et chez les oursins (BIAŁASZEWICZ '08, GLASER '14, SNYDER '25, PÉTERFI '27).

Les résultats de l'observation des œufs fécondés, qui ont attiré en premier lieu mon attention sur la vitesse de la formation du périvitellin nous démontre, comparaison faite avec les données du tableau VII, relatives à la formation du périvitellin dans les œufs vierges, que le dit phénomène, observé sur les œufs de Truite, est indépendant du processus de la fécondation. Un fait analogue a déjà été signalé par PRZYŁĘCKI pour les Amphibiens et les Crustacés.

La présence des électrolytes dans l'eau retarde la formation du périvitellin, tandis que les solutions même très concentrées d'anélectrolytes n'exercent sur le phénomène en question aucune influence retardatrice. La durée du séjour de l'œuf dans des solutions décimolaires de sels et de glucose, nécessaire à provoquer la séparation de la membrane de la cellule ovulaire, dépend de la solution employée (tabl. IX). La séparation de la membrane apparaissait déjà après 4 minutes de séjour de l'œuf dans l'eau ou dans la glucose, tandis que ce phénomène était sensiblement retardé dans les solutions d'électrolytes.

Tableau IX

Formation du périvitellin dans les solutions decinormales

Solution	NaCl	KCl	LiCl	CaCl ₂	MgCl ₂	K ₂ SO ₄	KNO ₃	KCNS	H ₂ O	glucose
Moment de la séparation de la membrane de la cellule ovulaire	68'	28'	113'	34'	7'	9'	18'	15'	3-4'	4'

On ne peut pas supposer que le moment de la séparation de la membrane dépende de la pression osmotique des solutions des électrolytes employés. La solution de MgCl₂ à pression osmotique plus élevée que celle du LiCl ou de NaCl, retarde la formation du périvitellin d'une façon moins prononcée. Mais à l'admission de cette hypothèse s'oppose avant tout le fait que la formation du périvitellin des œufs de Truite se poursuit normalement dans les solutions fortement hypertoniques des anélectrolytes. Dans le tableau X nous trouvons les données concernant l'augmentation du poids des œufs de Truite, placés dans des solutions à concentration croissante de la glucose, comparées avec l'augmentation du poids des œufs mis dans l'eau et dans le NaCl de 0.1 M.

Tableau X

Solution	Durée de l'expérience	Augmentation du poids des œufs de Truites en % du poids initial
Eau	15 minutes	15
"	90 "	18
Glucose 0.1 M	25 "	24
" 0.2 "	60 "	26
" 0.25 "	50 "	24
" 0.375 "	75 "	23
" 0.5 "	85 "	21
" 0.75 "	100 "	24
" 1.0 "	110 "	9
NaCl 0.1 "	120 "	5

Dans les solutions de 0.1 M—0.75 M de glucose le périvitellin atteint les dimensions normales et l'augmentation du poids des œufs est partout égale et rapprochée de celle, observée sur les œufs séjournant dans l'eau. C'est dans la solution de 1 M que l'on peut constater la

cytolysé à laquelle correspond une augmentation moins sensible du poids des œufs. Par contre, les œufs placés dans la solution de NaCl de 0.1 M même pour bien plus longtemps que ceux mis dans les solutions ci-dessus n'augmentent leur poids initial que de 5%, et leur périvitellin est moins développé que celui des œufs séjournant dans l'eau ou dans la glucose.

Mes expériences concernant l'influence des électrolytes sur la formation du périvitellin ne sont guère suffisantes à caractériser le rôle des différents ions dans ce processus. Elles nous permettent néanmoins de conclure, que les solutions hypotoniques des électrolytes empêchent la formation du périvitellin.

Dans les œufs du *Salmo salvelinus*, mis dans la solution de RINGER le périvitellin ne se forme point, d'après RUNNSTRÖM, et les membranes ovulaires restent fragiles; les mêmes œufs après 24 heures de séjour dans la solution de RINGER, sont encore fécondables dans l'eau ordinaire et s'y développent normalement.

Les tableaux ci-dessous, renfermant les chiffres qui illustrent les variations des volumes des œufs (XI), du périvitellin (XII) et de la cellule ovulaire (XIII) dans les solutions de la glucose de 0.7 M et dans l'urée de 0.8 M, nous démontrent encore plus nettement, que les solutions hypertoniques des anélectrolytes n'empêchent ni l'absorption de l'eau ni la formation du périvitellin. Les œufs, séjournant dans la glucose de 0.7 M et dans l'urée de 0.8 M, augmentent leur volume initial de 20% env. ainsi que dans l'eau.

Le volume des cellules ovulaires subit les mêmes variations dans les solutions sus-indiquées que dans l'eau. On y constate aussi une légère diminution du volume de la cellule au premier temps du séjour des œufs dans les dites solutions. Le périvitellin se forme dans la glucose de 0.7 M avec un certain retard, mais ses dimensions définitives ne diffèrent pas beaucoup de celles du périvitellin des œufs mis dans l'eau.

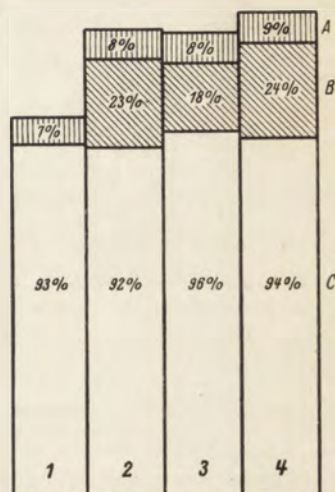


Fig. 4. Variations du volume des œufs de Truite dans les différents milieux. 1 — volume de l'œuf « sec », 2 — volume de l'œuf après le séjour de 2 heures dans l'eau, 3 — volume de l'œuf après le séjour de 2 heures dans la glucose de 0.7 M, 4 — volume de l'œuf après le séjour de 2 heures dans l'urée de 0.8 M. A — volume de la membrane, B — volume du périvitellin, C — volume de la cellule ovulaire. Toutes les valeurs numériques expriment les pourcents du volume initial de l'œuf.

La pression osmotique des solutions employées dans mes expériences était deux fois environ plus forte que celle des œufs ($\Delta = 0.6^\circ$, voir le chapitre suivant), le volume des œufs augmentait néanmoins et leur péritivellin se formait normalement. Ces faits nous prouvent que les processus de l'absorption de l'eau par les œufs et de la formation du péritivellin sont indépendants de la pression osmotique du milieu ambiant, en tant que celle-ci ne dépasse pas certaines limites (fig. 2, 3, 4).

L'action retardatrice des électrolytes sur la formation du péritivellin a un caractère spécifique dont la nature est difficile à préciser à l'état actuel de nos connaissances.

Tableau XI

Augmentation du volume des œufs de Truites dans des solutions hypertoniques de glucose (A) et d'urée (B), exprimée en % de leur volume initial

A								
Durée du séjour dans la glucose de 0.7 M	5 minutes	10 minutes	15 minutes	25 minutes	30 minutes	50 minutes	60 minutes	240 minutes
N° 1	2	5	4	—	—	7	7	9
N° 2	5	9	12	—	—	20	20	22
N° 3	5	9	7	—	—	16	16	19
N° 4	—	6	11	14	18	—	—	—
N° 5	—	2	5	11	11	—	—	—
N° 6	—	11	17	20	20	—	—	—
N° 7	—	6	8	16	19	—	—	—
N° 8	—	4	11	12	14	—	—	—

B									
Durée du séjour dans l'urée de 0.8 M	5 minutes	10 minutes	15 minutes	25 minutes	35 minutes	45 minutes	90 minutes	120 minutes	18 heures
N° 1	11	18	23	27	27	27	27	27	25
N° 2	6	13	17	20	20	20	20	20	17

Tableau XII

Volume du péritellin des œufs placés A dans la glucose de 0.7 M et (B) dans l'urée de 0.8 M, en % du volume initial de l'œuf

A								
Durée du séjour dans la glucose	5 minutes	10 minutes	15 minutes	25 minutes	30 minutes	50 minutes	60 minutes	240 minutes
N° 1	2	7	8	—	—	14	14	14
N° 2	0	5	9	—	—	17	17	18
N° 3	0	1	8	—	—	14	14	15
N° 4	—	4	8	11	14	—	—	—
N° 5	—	4	8	12	13	—	—	—
N° 6	—	4	9	13	14	—	—	—
N° 7	—	5	9	12	12	—	—	—
N° 8	—	3	9	11	12	—	—	—

B									
Durée du séjour dans l'urée	5 minutes	10 minutes	15 minutes	25 minutes	35 minutes	45 minutes	90 minutes	120 minutes	18 heures
N° 1	11	19	22	23	24	24	24	24	20
N° 2	10	13	19	19	22	22	22	22	15

Tableau XIII

Variations du volume de la cellule ovulaire (A) dans la glucose de 0.7 M et (B) dans l'urée de 0.8 M (unités relatives)

A							
Durée du séjour dans la glucose	0 minutes	5 minutes	10 minutes	15 minutes	50 minutes	60 minutes	240 minutes
N° 1	100	100	97	95	92	92	95
N° 2	100	105	103	103	102	102	103
N° 3	100	105	107	99	102	102	102

B

Durée du séjour dans l'urée	0 minutes	5 minutes	10 minutes	15 minutes	20 minutes	25 minutes	30 minutes	50 minutes	120 minutes	18 heures
N° 1	100	100	98	100	97	103	101	101	101	103
N° 2	100	93	99	96	98	100	97	97	97	101

Pression osmotique

La pression osmotique dans les œufs des *Salmonides* a été déterminée par SCHMIDT-NIELSEN ('10), RUNNSTRÖM ('20) et GRAY ('20).

Comme l'ont fait les auteurs cités, j'ai employé dans mes recherches la méthode cryoscopique, en me servant de l'appareil de DEKHUYZENE.

En tenant compte de la quantité considérable de l'eau absorbée par l'œuf, on a pu admettre d'avance que la pression osmotique des œufs mis dans l'eau au moment de la fécondation doit sensiblement diminuer. Afin de résoudre cette question j'ai déterminé le point de congélation des œufs broyés. La comparaison des points de congélation des œufs « secs » et de ceux des œufs « humides », ces derniers soit vierges soit fécondés, qui ont séjourné un certain temps dans l'eau, démontre d'une façon indubitable la justesse de la supposition ci-dessus.

Les résultats des mesurages du point de congélation des œufs broyés provenant d'une seule et même femelle sont les suivants:

- △
- 1) œufs « secs » 0.640°
 - 2) œufs « humides » vierges après 30 h. de séjour dans l'eau 0.383°
 - 3) liquide coelomatique 0.615°

Ces chiffres prouvent que la pression osmotique des œufs vierges, placés dans l'eau est sensiblement inférieure à celle des œufs « secs », c. à d., de ceux qui n'ont pas été mis en contact avec l'eau.

Le point de congélation déterminé dans les œufs broyés provenant d'autres femelles confirme les résultats précédents et notamment:

- △
- a) œufs « secs » 0.644°
 - b) œufs fécondés après 18 h. de séjour dans l'eau (stade de 8 blastomères) 0.446°
 - c) œufs fécondés après 20 h. de séjour dans l'eau (stade de 12 blastomères) 0.437°
 - d) œufs vierges après 23 jours de séjour dans l'eau . . 0.391°

Il s'ensuit que: 1) les œufs sortis des ovaires demeurent dans le liquide coelomatique dont la pression osmotique se rapproche beaucoup de celle des œufs eux-mêmes, et 2) la pression osmotique des œufs fécondés et des œufs vierges de la Truite subit dans l'eau une diminution qui correspond à 30—40% de la pression osmotique des œufs «secs», pris immédiatement de la cavité du corps de la femelle¹.

Suivant les recherches de GRAY ('20) la pression osmotique des œufs de la Truite reste invariable après la fécondation. Les valeurs de la pression osmotique, trouvées par cet auteur sont les suivantes:

œufs vierges $\Delta = 0.46, 0.52, 0.48$;

œufs fécondés $\Delta = 0.44, 0.53, 0.47$.

De ses résultats GRAY conclut que les œufs de la Truite, par opposition à ceux des Amphibiens, ne subissent sous l'influence de la fécondation aucun abaissement de leur pression osmotique.

La conclusion de GRAY est juste en tant qu'il affirme, que la fécondation n'exerce aucune influence sur les variations de la pression osmotiques des œufs. Conformément aux résultats de mes recherches, l'abaissement du point de congélation des œufs de la Truite ne dépend nullement en effet de la fécondation, c'est-à-dire de la pénétration des spermatozoïdes dans l'œuf.

Mais cette partie de la conclusion, où GRAY oppose les œufs de Truites aux œufs des Amphibiens au point de vue de l'invariabilité de leur pression osmotique, serait le résultat d'un malentendu. En effet, cet auteur compare dans ses recherches le point de congélation des œufs fécondés et des œufs vierges qui ont séjourné déjà un certain temps dans l'eau. Or, les œufs vierges «humides» comme nous le prouvent les résultats de mes recherches, s'imbibent d'eau au même degré que les œufs fécondés et leur pression osmotique baisse de 40% env. par rapport à celle des œufs vierges «secs», qui n'ont pas été mis en contact avec l'eau. A ce point de vue les œufs de Truites se comportent de la même manière que les œufs des Amphibiens.

PRZYBYCKI ('17) a constaté que la pression osmotique des œufs de grenouille soit fécondés, soit vierges, mis dans l'eau, diminue au même degré. D'après cet auteur, la pression osmotique des œufs de grenouille pris de l'oviducte correspond à $\Delta = 0.492^0$, tandis que dans les œufs fécondés et les œufs vierges la dite pression correspond après 3 heures de séjour dans l'eau à $\Delta = 0.15—0.05^0$. Nous y constatons

¹ Ce fait a été confirmé récemment aussi par SVETLOV ('29).

donc les mêmes valeurs que celles trouvées par BACKMANN et RUNNSTRÖM pour les œufs fécondés de grenouille.

RUNNSTRÖM ('20) a trouvé en outre que la pression osmotique des œufs fécondés du *Salmo salvelinus* est inférieure à celle des œufs vierges « secs ». La pression de ces derniers correspondant à $\Delta = 0,645^{\circ}$ est par conséquent égale à celle des œufs « secs » de Truites, constatée au cours de mes recherches; par contre, le degré de l'abaissement de la pression osmotique des œufs du *Salmo salvelinus* fécondés est, d'après l'auteur cité, inférieur (7%) à celui trouvé par moi pour les œufs du *Salmo fontinalis* (30%).

La différence entre les résultats obtenus par RUNNSTRÖM et par moi pourrait s'expliquer par la différence spécifique des objets de nos expériences, mais il est également possible qu'elle soit purement accidentelle, la quantité d'eau absorbée par les œufs d'une seule et même espèce, subissant des variations considérables, comme il ressort de mes recherches.

Il résulte donc des faits relatés que 1) contrairement à l'opinion de GRAY et de HÖBER, la pression osmotique des œufs soit vierges soit fécondés, des *Salmonides*, diminue dans un degré plus ou moins considérable au cours de leur séjour dans l'eau, 2) ce phénomène a été observé dans tous les groupes d'animaux étudiés à ce point de vue, dont le développement se poursuit dans un milieu hypotonique, tels Oiseaux, Amphibiens, Poissons et Crustacés — et présente par conséquent un caractère général.

A l'intérieur de l'organisme maternel les œufs des Truites se trouvent dans un milieu isotonique. Placés dans l'eau, ils en absorbent une quantité considérable qui ne peut rester sans l'influence sur leur pression osmotique. Il s'agit seulement de savoir, si la quantité d'eau absorbée est suffisante à expliquer la diminution de cette pression, ou bien si le dit processus résulte en même temps de l'élimination d'une certaine quantité de substances osmotiques contenues dans la cellule.

Conformément aux résultats des mes recherches, la quantité d'eau absorbée par les œufs de Truites correspond à 20% du volume des œufs « secs », tandis que la diminution respective de leur pression osmotique est égale à 30—40%. Si l'ooplasme était une solution simple, l'addition d'une quantité d'eau égale à 20% du volume de celui-ci pourrait produire un abaissement de 16.7% de sa pression osmotique. Or, nous n'ignorons pas que le plasma est une solution hétérogène, dans laquelle on trouve à côté de la phase aqueuse, la phase dispersée, ne pouvant

jouer qu'un rôle minime dans les propriétés osmotiques de la cellule. Il y a donc lieu de supposer que le degré d'abaissement de la pression osmotique de l'œuf ne dépend pas du rapport entre le volume d'eau absorbée et le volume de l'œuf, le rapport décisif à ce point de vue est celui du volume de l'eau absorbée au volume de la phase aqueuse de l'œuf.

Donc, pour apprécier l'influence que l'eau absorbée par l'œuf exerce sur l'abaissement de la pression osmotique, il faut déterminer le volume de la phase aqueuse de l'œuf.

En première approximation on peut admettre que le volume de la phase aqueuse est égal au volume de l'eau contenue dans l'œuf.

La quantité d'eau contenue dans les œufs de Truites a été déterminée par TANGL et FARKASS ('04) à 66,12%, par FAURÉ-FRÉMIET et GARRAULT ('22) à 58,5% et par KRONFELD et SCHEMINZKY ('26) à 66,2—68,5% de leur poids. Les chiffres de TANGL et FARKASS et ceux de KRONFELD et de SCHEMINZKY concernant les œufs qui ont séjourné quelque temps dans l'eau, nous pouvons prendre en considération dans nos calculs exclusivement les données de FAURÉ-FRÉMIET et de GARRAULT.

En tenant compte du volume spécifique de l'ooplasmе de Truites, égal, selon BIAŁASZEWICZ ('27), à 0,92, nous obtenons pour le volume de l'eau contenue dans l'œuf la valeur de 63,6% du volume de l'œuf. Ce chiffre représente la valeur approximative du volume de la phase aqueuse dans l'œuf « sec » de Truites. Vu que l'œuf placé dans l'eau en absorbe une quantité correspondant à 20% env. de son volume initial, le volume de l'eau absorbée sera égal à 31,5% de celui de la phase aqueuse de l'œuf. D'après ces considérations, il faudrait croire que l'abaissement de la pression osmotique des œufs placés dans l'eau doit présenter la valeur de 24% env. de la pression initiale. Conformément à mes mesurages, cette valeur est égale à 30—40%. Nous constatons, par conséquent, que les valeurs calculées et les valeurs trouvées expérimentalement se rapprochent. La concordance de ces chiffres serait probablement encore plus accentuée, si nous étions à même de calculer la quantité d'eau intimement liée aux colloïdes plasmatiques. La quantité d'eau unie d'une façon permanente aux constituants colloïdaux du plasma est, d'après RUBNER ('22), très considérable et constitue dans la paroi aortique 17,4% dans les muscles cardiaques du bœuf 18,3% dans les muscles striés 24,1%, et atteint dans les corpuscules sanguins jusqu'à 42,7% de la quantité totale de l'eau contenue dans les tissus respectifs.

La concordance des valeurs trouvées et calculées conduit à la supposition, que la pression osmotique des œufs soumis au séjour dans l'eau, est conditionnée en prépondérance — si non exclusivement — par la quantité de l'eau absorbée.

La perte des électrolytes, si perte il y a, ne peut avoir lieu que dans des limites très restreintes. Cette conclusion s'accorde parfaitement avec les recherches de GRAY ('20). Suivant cet auteur, la conductibilité électrolytique de l'eau, dans laquelle ont séjourné les œufs de Truites ne subit point de variations appréciables. Le même phénomène a été trouvé par McCLENDON ('14 et '15b) chez *Esox* et *Fundulus*, dont les œufs placés dans l'eau ne perdent pas leurs électrolytes.

La comparaison des données relatives aux variations de la pression osmotique qui ont lieu dans les œufs des Amphibiens et des Poissons, prouve, qu'il n'y a entre ces deux catégories d'œufs qu'une différence purement quantitative. Dans les œufs de grenouille l'abaissement de la pression osmotique s'élève jusqu'à 90% env. (BACKMANN et RUNNSTRÖM, '09, '12 et PRZYŁĘCKI, 17), tandis que dans les œufs de la truite cet abaissement ne dépasse pas, conformément aux résultats de mes recherches 40% de la pression initiale.

L'état actuel des recherches, suggère, pour expliquer la différence entre la manière de se comporter des œufs d'Amphibiens et ceux de Poissons, l'interprétation suivante: la diminution de la pression osmotique des œufs de Poissons serait causée en premier lieu par la quantité d'eau absorbée, et celle des œufs d'Amphibiens — par l'absorption de l'eau et par l'élimination simultanée des électrolytes (McCLENDON '15a, VOSS, '26).

La diminution de la pression osmotique des œufs fécondés de grenouille fut expliquée par BACKMANN et par RUNNSTRÖM de la manière suivante: sous l'influence de la fécondation se produisent dans l'ooplasmе les processus de gélification, au cours desquels une certaine quantité d'électrolytes est absorbée par les colloïdes plasmatiques. Suivant ces auteurs, les quantités d'eau absorbée par l'œuf sont trop insignifiantes pour provoquer le considérable abaissement de la pression osmotique, constaté par eux. Il y a pourtant lieu de signaler, que les auteurs mentionnés n'ont point déterminé la quantité d'eau absorbée par l'œuf ni pris en considération dans leur raisonnement, que la diminution de la pression osmotique de l'œuf dépend du rapport entre le volume de l'eau absorbée et celui de la phase aqueuse de l'ooplasmе.

Une explication différente de ce phénomène fut fournie par BIAŁASZEWICZ ('12). Ce dernier suppose que l'abaissement de la pression osmotique observé par lui après la fécondation dans l'œuf de grenouille résulte de l'élimination par la cellule des substances osmotiques qui, par suite de l'imperméabilité de la membrane vitelline, restent entre la surface de l'œuf et la membrane et provoquent la formation du périvitellin.

Ainsi il paraît évident que ni l'une ni l'autre des hypothèses ci-dessus ne peut servir à expliquer les résultats de mes recherches sur les œufs de Truites.

La membrane de l'œuf de Truites étant complètement perméable aux cristaalloïdes, l'élimination de ces substances dans l'espace périvitellinaire ne peut pas provoquer la formation du périvitellin, vu que ces substances peuvent passer à travers la membrane dans le milieu ambiant. Le phénomène de la formation du périvitellin dans les œufs de Truites et probablement dans ceux d'autres poissons d'eau douce, peut être expliqué comme il suit:

Au cours de la diminution du volume de la cellule ovulaire, observée après le transfert de l'œuf dans l'eau, l'ooplasme élimine dans l'espace périvitellinaire des substances colloïdales se distinguant par la propriété de s'imbiber d'eau. Ces substances, en s'imbibant d'eau, augmentent considérablement leur volume et ne pouvant pas passer à travers la membrane, qui leur est imperméable, provoquent une série de phénomènes, qui s'observent dans l'œuf placé dans l'eau, tels: turgescence, augmentation du volume de l'œuf, formation du périvitellin.

La formation du périvitellin dans un milieu hypertonique semble prouver la justesse de cette hypothèse.

On pourrait supposer, que dans un milieu hypertonique l'œuf va diminuer son volume ou bien modifier sa forme sphérique pour un temps plus ou moins prolongé. Toutefois les résultats de mes recherches sont en désaccord avec une telle supposition; le volume de l'œuf dans les solutions hypertoniques de glucose (0.7—0.75 M) et d'urée (0.8 M) commence à augmenter immédiatement après le transfert dans ces solutions et atteint les mêmes valeurs que le volume des œufs placés dans l'eau (fig. 2 et 4). Ce n'est que la concentration de la glucose supérieure à 1 mol qui provoque la diminution du volume de l'œuf, sa déformation et la cytolysse de la cellule ovulaire. Si la quantité de l'eau absorbée par l'œuf placé dans un milieu hypertonique et l'augmentation du volume

du péritellin résultait d'une différence entre la pression osmotique de l'œuf et celle du milieu ambiant, il faudrait admettre, que la pression osmotique de l'œuf est supérieure à celle de la glucose de 0.7 M, ce qui toutefois est en contradiction avec les résultats des mesurages cryoscopiques, la pression osmotique de l'œuf étant deux fois environ inférieure à celle de la glucose de 0.7 M.

La formation du péritellin dans les œufs placés dans un milieu hypertonique et l'augmentation de leur volume nous font conclure à l'existence, à l'intérieur de l'œuf, d'un agent capable non seulement de contre-balancer mais aussi de surpasser l'intensité de l'action déshydratante de ce milieu. Cet agent doit être localisé dans l'espace péritellinaire, puisque, comme nous l'avons vu, le volume de la cellule ovulaire ne subit que des variations insignifiantes; il doit en outre, avoir la nature des substances colloïdales qui ne diffusent pas à travers la membrane de l'œuf. L'augmentation du volume de l'œuf dans un milieu hypertonique serait le résultat de deux processus opposés: nous y avons d'une part l'action déshydratante du milieu et d'autre — l'absorption de l'eau par les colloïdes du péritellin.

J'ai établi au cours de mes recherches, que l'augmentation du volume de l'œuf et du péritellin atteint son maximum d'intensité dans les premiers moments du séjour des œufs dans un milieu hypertonique, c'est à dire, au moment où la différence entre la pression osmotique des œufs et celle du milieu ambiant est la plus grande. Ce fait nous donne une certaine idée du degré d'affinité des colloïdes péritellinaires pour l'eau.

En outre, l'hypothèse ci-dessus fournit, paraît-il, une réponse — au moins partielle — à la question posée au début du présent mémoire: quelles sont les causes qui maintiennent la différence entre la pression osmotique diminuée de l'œuf et celle du milieu aquatique?

Au fur et à mesure de l'absorption de l'eau par les colloïdes péritellinaires, leur affinité pour l'eau diminue, tandis que l'extension croissante de la membrane empêche de plus en plus l'augmentation du volume de l'œuf, en diminuant l'afflux de nouvelles quantités d'eau aux colloïdes du péritellin. Ainsi le volume définitif de l'œuf correspondrait à l'état d'équilibre entre les deux processus mentionnés.

À cet état d'équilibre les colloïdes du péritellin, bien que non saturés d'eau, ne peuvent cependant en absorber davantage et protègent la cellule ovulaire contre la pénétration d'une quantité excessive d'eau

du milieu ambiant, lequel phénomène devrait se produire en raison de la différence entre la pression osmotique de l'œuf et celle du milieu. La quantité d'eau qui passe du périvitellin dans la cellule ovulaire dépendrait par conséquent du degré de l'hydratation des colloïdes du périvitellin.

Ainsi suivant mon hypothèse on peut caractériser comme il suit le rôle du périvitellin et de la membrane dans le développement de l'œuf; la membrane étant peu extensible, empêche l'imbibition complète des colloïdes périvitellinaires, et ceux-ci à leur tour empêchent la pénétration de l'eau à l'intérieur de la cellule ovulaire.

Résumé

1. La membrane de l'œuf de Truites présente la structure fibrillaire.
2. La membrane de l'œuf placé dans l'eau devient élastique et résistante à l'action du NaOH.
3. La membrane de l'œuf est perméable dans les deux sens aux cristalloïdes et difficilement perméable aux colloïdes.
4. La perméabilité de la membrane ne varie pas au cours du développement de l'œuf.
5. L'œuf pris de la cavité du corps et mis dans l'eau en absorbe une quantité correspondant à 20% environ de son volume initial.
6. La pression osmotique des œufs fécondés aussi bien que des œufs vierges, placés dans l'eau, diminue de 30—40% par rapport à celle des œufs « secs », qui n'ont pas été mis en contact avec l'eau.
7. L'abaissement de la pression osmotique observé dans les œufs de Truites est indépendant de la fécondation. Ce phénomène est conditionné en premier lieu par la quantité d'eau absorbée par l'œuf.
8. La formation du périvitellin se produit parallèlement à l'absorption de l'eau par l'œuf. Le volume du périvitellin égale à peu près celui de l'eau absorbée.
9. Les solutions hypotoniques d'électrolytes empêchent le processus de la formation du périvitellin. Le périvitellin se forme, par contre, dans des solutions hypertoniques d'anélectrolytes.
10. Les faits constatés permettent de supposer que l'augmentation du volume de l'œuf, la formation du périvitellin et la turgescence de l'œuf dépendent du processus d'imbibition des colloïdes éliminés par la cellule ovulaire dans l'espace périvitellinaire.

BIBLIOGRAPHIE

- ATKINS, W. R., 1909. The osmotic pressure of the blood and eggs of birds. Dublin Sci. Proc. Roy. **12**, 123.
- BACKMANN, E. L. und RUNNSTRÖM, J., 1909. Physikalisch-chemische Faktoren bei der Embryonalentwicklung. Der osmotische Druck bei der Entwicklung von *Rana temporaria*. Biochem. Zeitschr. **22**, 290.
- — 1912. Der osmotische Druck während der Embryonalentwicklung von *Rana temporaria*. Pflügers Archiv **144**, 287.
- — 1912. Die Einwirkung der Befruchtung auf den osmotischen Druck der Eier von *Bufo vulgaris* und *Triton cristatus*. Pflügers Archiv **148**.
- BIAŁASZEWICZ, K., 1908. Beiträge zur Kenntnis der Wachstumsvorgänge bei Amphibienembryonen. Bull. Acad. Sc. Cracovie, 783.
- 1912. Über das Verhalten des osmotischen Druckes während der Entwicklung der Wirbeltierembryonen. Archiv f. Entw.-Mech. **34**, 489.
- 1921. Wpływ ciśnienia osmotycznego na szybkość rozwoju zarodków. Prace Instytutu im. Nenckiego. (L'influence de la pression osmotique sur la vitesse du développement des embryons.) Travaux de l'Institut Nencki **1**, No. 10.
- 1927. O zastosowaniu ultrafiltracji w badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w cytoplazmie. (Sur l'emploi de l'ultrafiltration pour l'étude de la répartition des électrolytes dans le cytoplasme.) Ibidem **4**, No. 57.
- FAURÉ-FREMIET, E. et GARRAULT, H., 1922. Constitution de l'œuf de Truite. Comptes Rend. Acad. des Sc. **174**, 1375.
- GLASER, O., 1914. The change in volume of *Arbacia* and *Asterias* eggs at fertilisation. Biol. Bull. **26**, 84.
- ✓ GRAY, J., 1920. On the relation of the animal cells to electrolytes. I. A physiological study of the egg of the trout. Journ. of Physiol. **53**, 308.
- HÖBER, R., 1926. Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. VI. Aufl.
- KRONFELD, P. und SCHEMINZKY, 1926. Beiträge zur physikalisch-chemischen Biologie der Forellenentwicklung. II. Mitteilung. Dotterresorption und Wasserhaushalt. Archiv f. Entw.-Mech. **107**, 129.
- MCCLENDON, J. F., 1914. On the parallelism between increase in permeability and abnormal development of fish eggs. Internat. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **1**, 28.
- 1915a. The preservation of the life of the frogs egg and the initiation of development by increase in permeability. Amer. Journ. of Physiol. **38**, 163.
- 1915b. The action of anesthetics in preventing increase of cell permeability. Ibidem **173**.
- MICHAELIS, L., 1914. Eine Mikroanalyse des Zuckers im Blut. Biochem. Zeitschr. **59**, 166.
- PÉTERFI, T., 1927. Die Abhebung der Befruchtungsmembran bei Seeigeleiern. Archiv f. Entw.-Mech. **112**, 660.
- PIRLLOT, 1925. Sur l'activation traumatique des œufs de *Petromyzon fluviatilis*. Comptes Rend. de la Soc. de Biol. **93**, 830.

- PRZYŁĘCKI, S., 1917. Spadek ciśnienia osmotycznego i rola periwitelinu w jajach płazów. (La diminution de la pression osmotique et le rôle du liquide périvitellin dans les œufs d'Amphibiens. Compt. Rend. de la Soc. des Sc. de Varsovie **10**, 323.)
- 1918. Warunki powstawania periwitelinu w jajach niezapłodnionych żaby płowej. (Les conditions de la formation du périvitellin dans les œufs vierges de *Rana temporaria*. Ibidem **11**, 751.)
- 1921. Zmiany ciśnienia osmotycznego w czasie rozwoju dzieworodnego zarodków rozwielitek. (Recherches sur la pression osmotique chez les embryons de Cladocères provenant des œufs parthénogénétiques). Travaux de l'Institut Nencki **1**, No. 6.
- 1921. Zmiany ciśnienia osmotycznego w czasie rozwoju zapłodnionych jaj rozwielitek. (Recherches sur la pression osmotique chez les embryons de Cladocères provenant des œufs fécondés.) Ibidem, No. 13.)
- RUBNER, M., 1922. Über die Wasserbindung in Kolloiden mit besonderer Berücksichtigung des quergestreiften Muskels. Abhandl. d. Preuß. Akad. d. Wissensch.
- ✓ RUNNSTRÖM, J., 1920. Über osmotischen Druck und Eimembranfunktion bei den Lachs-fischen. Acta Zoologica **1**.
- SCHMIDT-NIELSEN, S., 1910. Saltvandsfiske i ferskvand. Nyt Naturvidensk. Magazin.
- SVETLOV, P., 1929. Entwicklungsphysiologische Beobachtungen an Forelleneiern. Archiv f. Entw.-Mech. **114**, 771.
- SNYDER, CH. D., 1925. Egg-volumen and fertilisation membrane. Biol. Bull. **49**, 54.
- TANGL, F. und FARKAS, K., 1904. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. IV. Über den Stoff- und Energieumsatz im bebrüteten Forellenei. Arch. f. d. ges. Physiol. **104**, 624.
- VOSS, H., 1926. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Froschei. Archiv f. Entw.-Mech. **107**, 241.
- WHITEHORN, J. C., 1921. Simplified method for determination of chlorides in blood or plasma. Journ. of biol. Chem. **45**, 449.

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego i Stacja Zoologiczna w Neapolu]

M. Bogucki.

**O rzekomo hamującym wpływie cieczy celomatycznej jeźw-
ców na powstawanie błony zapłodnienia i na brózdowanie.**

*A propos de la prétendue action inhibitrice du liquide coelomique
d'Oursin sur la membranogénèse et la segmentation.*

Rękopis nadesłany w dniu 1. V. 1930 r.

D'après LILLIE ('19) et EPHRUSSI ('25), le développement anormal des oeufs qui n'ont pas été préalablement lavés avec de l'eau de mer est dû à l'action inhibitrice du liquide coelomique.

En effet, il ressort des recherches de ces auteurs que dans certains cas les oeufs fécondés dans le liquide coelomique se segmentent sans produire préalablement la membrane de fécondation, ou bien leur développement est complètement arrêté.

Dans les travaux cités on ne trouve aucune indication sûre concernant la nature de l'agent contenu dans le liquide coelomique qui exerce cette action inhibitrice sur le processus membrano-gène et sur la segmentation de l'oeuf.

Les expériences rapportées ci-dessous paraissent jeter quelque lumière sur cette question.

Les résultats de la première série de mes expériences, résumés dans le tableau I, confirment les faits établis par LILLIE et EPHRUSSI: l'action inhibitrice du liquide coelomique se montre être très capricieuse — seulement dans la moitié des cas examinés le soulèvement de la membrane était supprimé par l'action du liquide coelomique.

Dans une autre série d'expériences, dont quelques-unes sont résumées dans le tableau II, on a procédé de la façon suivante: on divisait le liquide coelomique en deux parties, dont l'une était constituée par le liquide „pur“ — on a obtenu celui-ci en faisant des petites incisions dans la peau périorale —, tandis que l'autre était additionnée du contenu du tube digestif.

Le tableau II (colonne *a*) nous démontre que les oeufs fécondés dans la fraction „pure“ du liquide coelomique ont tous formés leurs membranes et leur développement était tout-à-fait normal. Les choses se sont passées autrement dans le liquide coelomique additionné du contenu du tube digestif (colonne *b* du tableau II). Ici, dans la plupart des cas les oeufs fécondés n'ont pas formé leurs membranes.

Ces résultats prouvent que le liquide coelomique pur n'exerce aucune action inhibitrice sur la membranogenèse ni sur la segmentation des oeufs d'Oursin, et que cette action doit être attribuée au suc intestinal additionné au liquide coelomique.

Les données du tableau III confirment cette conclusion. Ce tableau nous présente le cas où le liquide coelomique additionné du contenu intestinal n'a exercé aucune influence sur les oeufs, toutefois l'extrait de la paroi du tube digestif de ce même animal se montrait très actif et supprimait presque complètement le soulèvement de la membrane de fécondation.

Vu que l'action inhibitrice des substances produites dans les parois du tube digestif peut être facilement neutralisée par l'eau de mer hyperalcaline (tableau IV) et par le chauffage (tableau V) on peut supposer que nous y avons à faire avec les enzymes intestinaux, inactifs dans le milieu alcalin.

Od wielu już lat została zwrócona uwaga badaczy na to, że jaja jeżowców, o ile nie przemyto ich uprzednio wodą morską, nie rozwijają się normalnie po zapłodnieniu.

LILLIE ('19) a następnie EPHRUSSI ('25) objaśniają to zjawisko hamującym wpływem cieczy celomatycznej.

LILLIE (l. c. str. 172 i następne) podaje, że ciecz celomatyczna działa hamująco na powstawanie błony zapłodnienia i rozwój jaj, zapłodnionych w cieczy celomatycznej własnego gatunku (*Arbacia*, *Asterias*).

To samo stwierdza EPHRUSSI u *Paracentrotus lividus*, dodając, że płeć osobnika, którego ciecz celomatyczną użyto w doświadczeniu, nie odgrywa roli, oraz że jaja, które pod działaniem cieczy celomatycznej nie wytworzyły błony, rozwijają się w wodzie morskiej zupełnie normalnie.

Obaj autorowie zaznaczają jednak wyraźnie, że działanie cieczy celomatycznej na jaja jest bardzo kapryśne. W jednych przypadkach działaniem płynu celomatycznego można całkowicie zahamować proces pobudzenia jaja do rozwoju, w innych zaś przypadkach płyn celomatyczny pozostaje bez żadnego wpływu na ten proces.

Żadna z wymienionych prac nie daje nam wskazówek, jakim to czynnikiem, zawartym w cieczy celomatycznej można przypisać hamujące jej działanie na proces powstawania błony zapłodnienia i na brózdowanie.

Niżej podane doświadczenia rzucają pewne światło na omawianą sprawę.

Materiał i metoda.

Wszystkie doświadczenia moje przeprowadzone były na jajach *Paracentrotus lividus* L.

Zapładnianie dokonywane było w t. zw. solniczkach, zawierających po 3 cm³ płynu celomatycznego, do których przenoszono po 1 kropli zawiesiny jaj, przemytych w wodzie morskiej, oraz odrobinę nierozcieńczonej spermy. W 15 minut po dodaniu spermy obliczano % jaj, które wytworzyły błonę zapłodnienia.

Używana do doświadczeń ciecz celomatyczna oddzielana była od koagulatu przez dekantację.

Wyniki doświadczeń.

W pierwszej serji doświadczeń, które ilustruje tabela I, zostały potwierdzone wyniki LILLIE'EGO i EPHRUSSI'EGO. Z liczby 20 doświadczeń tej tabeli w 10 przypadkach płyn celomatyczny wyraźnie hamuje powstanie błony, a niekiedy i podział jaj (№ 1, 4, 6), w dziesięciu zaś innych przypadkach podział jaj i powstanie błony mają przebieg zupełnie normalny.

Ta przypadkowość w ujawnianiu się hamującego wpływu cieczy celomatycznej na rozwój jaj nasunęła mi przypuszczenie, że czynnik hamujący nie stanowi składowej części cieczy celomatycznej, lecz dostaje się do niej z innych części organizmu, prawdopodobnie z jelita, w chwili otwierania skorupy zwierzęcia. Przy zabiegu tym bowiem niepodobna jest ustrzec się przed mniejszym lub większym uszkodzeniem przewodu pokarmowego, którego zawartość łatwo wówczas przedostaje się do jamy ciała.

T a b e l a I.

doświadczenia № de l'expérience	№ samicy de la femelle	Pochodzenie cieczy celomatycznej <i>Provenance du liquide coelomique</i>	% jaj z błonami <i>% des oeufs avec les membranes soulevées</i>	% jaj brózdku- jących <i>% des oeufs segmentés</i>
1	I	○ Parac. liv.	0	2
2	"	○ " "	0	36
3	II	○ " "	14	83
4	"	○ " "	0	0
5	"	○+○ " "	81	> 50
6	"	○ " "	0	1
7	"	○ Arbacia	72	> 50
8	III	○ Parac. liv.	0	> 50
9	"	○ " "	81	> 50
10	"	○+○ " "	> 50	> 50
11	"	○ " "	41	—
12	"	○ " "	12	71
13	IV	○ " "	51	> 50
14	"	○ " "	34	—
15	"	○ " "	49	—
16	"	○ " "	76	—
17	V	○ " "	1	96
18	"	○+○ " "	0	ca 100
19	"	○ " "	90	> 50
20	"	○ " "	1	ca 100

Dla rozstrzygnięcia, o ile powyższe przypuszczenie jest słuszne, dzieliłem ciecz celomatyczną na dwie części, z których jedna była „czysta“, t. j. nie zawierała domieszki, pochodzącej z przewodu pokarmowego, zaś druga była zmieszana z treścią jelita. W obu przypadkach oddzielano ciecz celomatyczną od koagulatu przez dekantację.

Płyn celomatyczny „czysty“ wydobywałem ze zwierząt przez ostrożne nacięcia skóry, otaczającej otwór gębowy. Po wytoczeniu kilku cm³ tego płynu otwierałem skorupę nożycami i pozo-

stałą część płynu mieszałem z zawartością jelita, używając tej mieszaniny do doświadczeń równoległych.

Wyniki tej serii doświadczeń przedstawia tabela II.

Tabela II.

doświadczenia № de l'expérience	% jaj z błonami % des oeufs avec les membranes soulevées		Stan jaj w b po 20 godz. État des oeufs dans b après 20 h.
	a w cieczy celomatycznej „czystej” dans le liquide coelomique „pure”	b w cieczy celomat. zmieszanej z sokiem jelita dans liquide coelomique + sucintestin.	
1	62	0	cytoliza cytolyse
2	85	59	—
3	> 50	> 50	—
4	100	100	blastule pływające blastules nageantes
5	100	81	† w stadium moruli au stade de morula
6	97	5	cytoliza cytolyse
7	95	4	cytoliza cytolyse
8	ca 100	90	8 blastomerów blastomères
9	79	0	cytoliza cytolyse
10	97	12	† w stadium moruli au stade de morula
11	64	46	„ „
12	81	0	cytoliza cytolyse
13	98	0	„
14	98	0	„
15	52	0	„

Uderza nas tu, że we wszystkich doświadczeniach, w których jaja były zapładniane w cieczy celomatycznej „czystej”, wytwarzały one błony w sposób normalny. Nadto zaś kontrola przeprowadzana w 20 godzin po zapłodnieniu, stwierdziła, że we wszystkich doświadczeniach rozwój postępował normalnie, wszędzie bowiem zarodki znajdowały się w stadium pływających blastul, podobnie jak w doświadczeniach kontrolnych, w których jaja były zapładniane w wodzie morskiej.

Natomiast w tych doświadczeniach, w których jaja zapładniane były w cieczy celomatycznej, zmieszanej z zawartością je-

lita, spostrzega się w przeważającej liczbie przypadków zahamowanie procesu powstawania błony, któremu często towarzyszy również zahamowanie brózdowania.

Wynik tej serii doświadczeń potwierdza sformułowane wyżej przypuszczenie, że ciecz celomatyczna jako taka nie wywiera hamującego wpływu ani na procesy powstawania błon zapłodnienia ani na brózdowanie. Czynnika hamującego te procesy należy poszukiwać w zanieczyszczeniach płynu celomatycznego przez zawartość jelita.

Tabela III.

	Skład środowiska <i>Composition du milieu</i>	% błon <i>% de membranes soulevées</i>
1	woda morską <i>eau de mer</i>	ca 100
2	ciecz celomatyczna <i>liquide coelomique</i>	ca 100
3	wyciąg z rozartego jelita w wodzie morskiej <i>extrait de la paroi du tube digestif dans l'eau de mer</i>	4
4	0.5 cm ³ wyciągu + 2 cm ³ wody morskiej 0.5 cm ³ de l'extrait + 2 cm ³ de l'eau de mer	40

W tabeli II znajdujemy kilka przypadków (№ 3, 4, 5, 8), w których jaja zapłodnione w cieczy celomatycznej, zmieszanej z sokiem jelitowym, wytwarzały normalne błony zapłodnienia, a więc w tych przypadkach sok jelitowy nie zawierał czynnika hamującego powstawanie błon. Objaśnienie dla tych wyjątkowych przypadków dają nam doświadczenia, w których jaja były zapłodniane równolegle w cieczy celomatycznej, zmieszanej z sokiem jelitowym, oraz w przygotowanym w wodzie morskiej wyciągu z pokrajanego i rozartego na miazgę jelita, pochodzącego z tego samego osobnika. Tabela III jest przykładem tego typu doświadczeń.

Okazuje się z nich, że gdy sok jelitowy dodany do cieczy celomatycznej nie ujawnia żadnego wpływu na powstawanie błony zapłodnienia, to wyciąg z jelita tegoż zwierzęcia hamuje ten proces w sposób wyraźny. Doświadczenia te wskazują więc, że znaj-

dowany w soku jelitowym czynnik, hamujący powstawanie błon zapłodnienia, jest umiejscowiony w ściankach przewodu pokarmowego.

Można więc przypuszczać, że poszukiwanym czynnikiem są produkty sekrecji przewodu pokarmowego i że stopień, w jakim ujawnia się hamujące proces aktywacji jaj działanie soku jelitowego, jest zależny od ilości tych produktów, wydzielonych do jamy jelita.

Tabela IV.

	Skład środowiska <i>Composition du milieu</i>	% błon <i>% de membranes soulevées</i>
1	woda morską <i>eau de mer</i>	99
2	ciecz celomatyczna <i>liquide coelomique</i>	0
3	0.5 cm ³ cieczy celomat. + 1 cm ³ wody morskiej <i>0.5 cm³ du liquide coelomique + 1 cm³ de l'eau de mer</i>	50
4	0.5 cm ³ cieczy celomat. + 1 cm ³ wody morskiej hiperalkalicznej <i>0.5 cm³ du liquide coelomique + 1 cm³ de l'eau de mer hyper- alcaline</i>	99

Z danych tabeli III widzimy, że rozcieńczenie wyciągu z jelita wodą morską osłabia hamujące działanie tego wyciągu. Znacznie łatwiej jednak osiągnąć można osłabienie tego działania, jeśli do rozcieńczenia wyciągu z jelita (ew. czynnego soku jelitowego) użyjemy wody morskiej hiperalkalicznej (2 cm³ NaOH ⁿ/₁₀ w 100 cm³ wody morskiej). Tabela IV stwierdza wyniki jednego z tego rodzaju doświadczeń. W doświadczeniu tym trzykrotne rozcieńczenie płynu celomatycznego, zmieszanego z sokiem jelitowym, podnosi liczbę jaj obłonionych do 50%, gdy takie same rozcieńczenie wodą hiperalkaliczną znosi całkowicie jego działanie.

Wspomniane ostatnio doświadczenia świadczyłyby o tym, że czynnikiem hamującym powstawanie błon może być zbyt wysoka koncentracja jonów wodorowych w soku jelitowym. Wyniki powyższe byłyby zgodne ze znanym faktem, że w metodzie LOEBA ('09) jaja, traktowane kwasem masłowym, wówczas tylko

wytwarzają błony, gdy zostaną przeniesione do wody morskiej alkalicznej, której pH, jak stwierdził CARTER ¹⁾ ('24), nie może być niższe, niż 8.1. W wodzie morskiej o pH niższem błony na jajach nie tworzą się wcale, aczkolwiek jaja takie mogą się rozwijać prawidłowo, jeśli poddamy je następnie działaniu hipertoni.

Mimo prawdopodobieństwa, że koncentracja jonów wodorowych odgrywa rolę w rozpatrywanem zjawisku, nie jest ona jedynym czynnikiem, który tu w grę wchodzi.

Stwierdziłem bowiem, że hamujące działanie soku jelitowego oraz wyciągu z jelita może być zniweczone również przez działanie wyższej temperatury (65 — 100°), którego przykład znajdziemy w tabeli V.

Tabela V.

	Skład środowiska <i>Composition du milieu</i>	% błon <i>% de membranes soulevées</i>
1	woda morska <i>eau de mer</i>	ca 100
2	ciecz celomatyczna <i>liquide coelomique</i>	0
3	0.5 cm ³ cieczy celomat. + 1 cm ³ wody morskiej hiperalkalicznej <i>0.5 cm³ du liquide coelomique + 1 cm³ de l'eau de mer hyper- alkaline</i>	94
4	ciecz celomatyczna ogrzewana przez 10' w 100° C <i>liquide coelomique chauffé pen- dant 10' à 100° C</i>	70

Przytoczone fakty nasuwają przypuszczenie, że omawianym tu czynnikiem, hamującym powstawanie błon zapłodnienia i bródkowanie, są produkowane w przewodzie pokarmowym substancje o charakterze enzymatycznym, które w środowisku alkalicznym są nieczynne.

Przypuszczenie takie zgodne byłoby z wynikami badań COHNHEIMA ('01). Autor ten stwierdził bowiem w jelicie jeźowców istnienie dużych ilości enzymów (diastaza, inwertaza), które w cieczy celomatycznej występowały w bardzo nikłych ilościach, bądź też wcale nie dawały się wykryć.

¹⁾ Cytowane według DALCQ'A ('28).

Streszczenie wyników.

1°. Ciecz celomatyczna jeżowców sama przez się nie wpływa hamująco ani na proces tworzenia się błony zapłodnienia ani na brózdtkowanie jaj.

2°. Spotykany często w cieczy celomatycznej czynnik, hamujący powstawanie błon zapłodnienia, pochodzi z przewodu pokarmowego, którego zawartość miesza się z cieczą celomatyczną w chwili otwierania skorupy zwierzęcia.

Czynnikami tym są prawdopodobnie enzymy przewodu pokarmowego, które w środowisku alkalicznym są nieczynne.

Piśmiennictwo.

Carter G. S. 1924. On the early development of the Echinoderm egg. Proc. Cambridge Ph. Soc. **Cohnheim O.** 1901. Versuche über Resorption, Verdauung und Stoffwechsel von Echinodermen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33** (9). **Dalcq A.** 1928. Les bases physiologiques de la fécondation et de la parthénogénèse. Presses Universitaires de France. Paris. **Ephrussi B.** 1925. Sur la membrane de fécondation de l'oeuf d'Oursin. Action du liquide coelomique. C. R. Acad. Sc. **180** (775). **Lillie F. R.** 1923. Problems of fertilization. University of Chicago Press. **Loeb J.** 1909. Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies. Berlin. Springer.

Méthodes nouvelles de vérification des hypothèses.

Par

J. Neyman (Warszawa).

(Laboratoire Biométrique de l'Istitut de Nencki, Soc. Scient. de Varsovie).

La question de savoir si une hypothèse statistique peut être admise ou non remonte aux temps de Bayes, dont on connaît la formule, donnant la probabilité *a posteriori* de l'hypothèse considérée. On sait cependant, que pour pouvoir appliquer cette formule, on doit connaître les probabilités *a priori* des toutes les hypothèses admissibles et incompatibles. Malheureusement il nous manquent en général des renseignements sur ce point, et, pour appliquer la formule de Bayes, on est conduit à admettre une hypothèse supplémentaire, tout-à-fait étrangère au calcul des probabilités ainsi qu'à la question pratique considérée, ce qui cause que les résultats des calculs qui en suivent deviennent arbitraires.

Les circonstances ci-dessus ont été connues depuis longtemps et on a commencé de se méfier de la formule de Bayes et de tout ce qui pouvait paraître du même ordre d'idée. En particulier on se méfiait de considérer les hypothèses alternatives et les probabilités du fait observé, qui en suivaient.

Comme les questions d'application pressaient, on a inventé une nouvelle méthode de juger les hypothèses statistiques. Elle peut être précisée comme il suit.

Soit E_1 un événement qu'on a observé et H — une hypothèse statistique concernant E_1 . Si l'hypothèse H était vraie, il pourrait se produire outre l'événement E_1 aussi un des événements $E_2, E_3, \dots, E_n, \dots$, tous incompatibles entre eux et avec E_1 . On considère un caractère, numérique ou non, du fait E_i (pour $i = 1, 2, \dots$). Ce sera une fonction $f(E_i)$ du fait considéré.

Pour que l'hypothèse H soit ce qu'on appelle une hypothèse statistique simple, il faut qu'elle détermine la probabilité de chaque événement E_i . Admettons que H est une hypothèse simple. Alors, quelle que soit la fonction $f(E)$, on pourra calculer la loi de probabilité concernant f , c'est-à-dire la probabilité P pour que $f(E)$ ait une telle valeur donnée.

La méthode mentionnée de juger les hypothèses, que nous appellerons la méthode orthodoxe, consiste alors en ce qu'on considère l'hypothèse H comme inadmissible si la probabilité pour qu'on ait

$$(1) \quad f(E) = f(E_1)$$

est petite. En d'autres termes, on mesure la vraisemblance de l'hypothèse avec la valeur (qu'elle détermine) de la probabilité d'un certain caractère du fait observé.

On voit, qu'en appliquant la méthode orthodoxe on ne considère pas les hypothèses alternatives, qui pourraient aussi servir pour expliquer le fait observé E .

Les premières critiques contre la méthode orthodoxe remontent — à ce que je sais — à Bertrand¹⁾. Il remarque que dans des cas fréquents les probabilités de toutes les valeurs que peut prendre la fonction $f(E)$ sont très petites, ce qui ne pourrait empêcher l'hypothèse H d'être quelquefois vraie.

M. Borel²⁾, qui discute aussi des questions analogues, fait observer que la possibilité d'un jugement correct d'une hypothèse statistique dépend du choix du caractère du fait observé $f(E)$, qui doit être en quelque sorte „remarquable“. Or cette notion un peu vague du caractère remarquable peut être précisée, dans le cas où on convient de considérer aussi les hypothèses alternatives.

La communication présente contient: 1) des considérations destinées à indiquer que la méthode orthodoxe, sans une définition précise du caractère remarquable, peut conduire à des contradictions; 2) la définition de ce qu'on appelle la vraisemblance de l'hypothèse et ce qu'on pourrait nommer aussi le caractère remarquable. Les résultats sous 2) ont été publiés antérieurement³⁾.

¹⁾ Calcul des Probabilités. Paris 1907.

²⁾ Le hasard. Paris 1920.

³⁾ Vide: 1° J. Neyman and E. S. Pearson: „On the use and interpretation of certain test criteria for purposes of statistical inference“. Biometrika Vol. XX-A. pp. 175—240 et 263—294.

1) L'insuffisance de la méthode orthodoxe peut être démontrée par beaucoup d'exemples. Je veux citer ici un qui me semble intéressant.

Supposons que le fait observé E consiste en n valeurs d'une variable accidentelle x ,

$$(2) \quad x_1, x_2, \dots, x_n.$$

Admettons qu'on sait que la variable x suit la loi de Gauss

$$(3) \quad \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-a)^2}{2\sigma^2}}$$

mais que l'on ignore la valeur de la constante a . L'hypothèse H consiste en ce que $a = 0$. Désignons par x_0 la moyenne arithmétique des nombres (2) et par S — l'écart moyen quadratique. On aura donc

$$(4) \quad nx_0 = \sum_{i=1}^n x_i; \quad nS^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - x_0)^2$$

Pour vérifier l'hypothèse H , Mr. „Student“¹⁾ a proposé de calculer le caractère z du fait observé, où

$$(5) \quad z = \frac{x_0}{S}$$

La loi de probabilité concernant z est donnée par la fonction

$$(6) \quad \varphi(z) = \frac{C}{(1+z^2)^2}$$

où C est une constante telle que

$$(7) \quad \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(z) dz = 1$$

2° J. Neyman: „Contribution theory of certain test criteria“. Bull. de l'Institut International de Statistique 1929.

3° J. Neyman: „Sur la limite de la vraisemblance de l'hypothèse“. Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, t. 188. p. 1360.

4° J. Neyman: „Sur une méthode de vérification des hypothèses“. Ibidem p. 1467.

5° E. S. Pearson and Adyanthaya: „The distribution of frequency constants in small samples from symmetrical populations“. Biometrika Vol. XX-A pp. 356—360.

1) Biometrika Vol. VI.

Le choix du caractère z a été considéré comme très heureux parce que la loi de probabilité $\varphi(z)$ est indépendante de σ — le second paramètre intervenant dans la formule de Gauss, dont la valeur dans bien des cas est inconnue.

Soit z_1 la valeur de z correspondant aux nombres (2). La vérification de l'hypothèse H consiste alors en ce qu'on évalue l'intégrale

$$(8) \quad P(z_1) = 2 \int_{|z_1|}^{\infty} \varphi(z) dz$$

donnant la probabilité $P(z)$, déterminée par l'hypothèse H , pour qu'on ait une valeur de z aussi, ou moins probable que celle donnée par l'observation. Si cette probabilité est petite, on rejette l'hypothèse H et inversement.

Or, si l'on accepte le point de vue orthodoxe, rien ne peut empêcher de considérer un autre caractère du fait observé, par exemple

$$(9) \quad \zeta = \frac{\sum \xi}{\Sigma}$$

où ξ et Σ sont défini comme il suit. Soit

$$(10) \quad a_1, a_2, \dots, a_n$$

une suite des nombres satisfaisant à une seule condition

$$(11) \quad \sum_{i=1}^n a_i^2 = 1$$

d'ailleurs quelconques. Alors

$$(12) \quad \zeta \sqrt{n} = \sum_{i=1}^n a_i x_i$$

$$(13) \quad n \Sigma^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - a_i \zeta \sqrt{n})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - n \zeta^2.$$

On voit aisément que le caractère z est un cas spécial de ζ , correspondant à $a_i = \frac{1}{\sqrt{n}}$ pour $i = 1, 2, \dots, n$. Nous allons maintenant déduire la loi de probabilité de ζ qui est indépendante des nom-

bres (10). La loi de probabilité déterminée par l'hypothèse H et concernant l'ensemble des variables (2) est donnée par

$$(14) \quad \text{Const} \times e^{-n \frac{\xi^2 + \Sigma^2}{2\sigma^2}}$$

car $\Sigma x_i^2 = n(\xi^2 + \Sigma^2)$.

Posons

$$(15) \quad \begin{aligned} x_1 &= \sqrt{n} a_1 \xi + a_1 \sum_{i=1}^{n-1} u_i \\ x_k &= \sqrt{n} a_k \xi - \frac{\sum_{i=1}^{k-1} a_i^2}{a_k} u_{k-1} + a_k \sum_{i=k}^{n-1} u_i \quad (\text{pour } k = 2, 3, \dots, n) \end{aligned}$$

où $\xi, u_1, u_2, \dots, u_{n-1}$ sont de nouvelles variables.

On voit que l'on a identiquement

$$(16) \quad \sqrt{n} \xi = \sum_{i=1}^n a_i x_i; \quad n \Sigma^2 = \sum_{i=1}^{n-1} A_i^2 u_i^2$$

où

$$(17) \quad A_i^2 a_{i+1}^2 = \sum_{k=1}^i a_k^2 \sum_{k=1}^{i+1} a_k^2$$

et

$$(18) \quad \left| \frac{\partial(x_1, x_2, \dots, x_n)}{\partial(\xi, u_1, \dots, u_{n-1})} \right| = \sqrt{n} \frac{\prod_{i=1}^{n-1} \sum_{k=1}^i a_k^2}{\prod_{i=1}^n |a_i|}$$

Pour que la transformation ait un sens il est nécessaire et suffisant que $a_i \neq 0$ pour $i = 1, 2, \dots, n$, ce que nous allons supposer. La probabilité élémentaire de $\xi, u_1, u_2, \dots, u_{n-1}$ sera donc

$$(19) \quad \text{Const} \times e^{-n \frac{\xi^2 + \Sigma^2}{2\sigma^2}}$$

où Σ^2 a l'expression (16). Procédons maintenant à une nouvelle transformation qui va introduire Σ comme une variable indépendante. Soit

$$(20) \quad A_1 u_1 = \sqrt{n} \Sigma \prod_{i=1}^{n-2} \cos \varphi_i$$

$$A_k u_k = \sqrt{n} \Sigma \sin \varphi_{k-1} \prod_{i=k}^{n-2} \cos \varphi_i \quad (\text{pour } k=2, 3, \dots, n-1)$$

On a identiquement

$$(21) \quad \sum_{i=1}^{n-1} A_i^2 u_i^2 = n \Sigma^2$$

La transformation est valable, lorsque

$$(22) \quad \left| \frac{\partial(u_1, u_2, \dots, u_{n-1})}{\partial(\Sigma, \varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_{n-2})} \right| = \Sigma^{n-2} \prod_{i=1}^{n-1} A_i^{-1} \prod_{i=1}^{n-2} |\cos^{i-1} \varphi_i| \neq 0$$

donc si $\cos \varphi_i \neq 0$ pour $i = 2, 3, \dots, n-2$.

Si les nombres (10) sont tous différents de zéro, l'espace des variables (2) est transformée dans l'espace des variables $\xi, \Sigma, \varphi_1, \varphi_2, \varphi_{n-2}$ où ξ est quelconque et les autres variables sont limitées par des inégalités

$$(23) \quad \begin{aligned} 0 &< \Sigma \\ 0 &\leq \varphi_i \leq 2\pi \\ -\frac{\pi}{2} &< \varphi_i < \frac{\pi}{2}, \quad i = 2, 3, \dots, n-2 \end{aligned}$$

Il y a l'exception pour les points correspondant à

$$(24) \quad \cos \varphi_i = 0 \quad i = 2, 3, \dots, n-2$$

mais nous pouvons ne pas en tenir compte puisqu'ils forment un ensemble de mesure nulle.

Pour avoir la probabilité élémentaire concernant ξ et Σ il ne reste que d'intégrer celle concernant $\xi, \Sigma, \varphi_1, \dots, \varphi_{n-2}$, savoir

$$(25) \quad \text{Const} \times \Sigma^{n-2} e^{-n \frac{\xi^2 + \Sigma^2}{2\sigma^2}} \prod_{i=1}^{n-2} \cos^{i-1} \varphi_i$$

par rapport à $\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_{n-2}$ entre les limites (23). Le résultat est donné par l'expression

$$(26) \quad \text{Const} \times \Sigma^{n-2} e^{-n \frac{\xi^2 + \Sigma^2}{2\sigma^2}}$$

Pour obtenir la loi de probabilité de ζ posons

$$(27) \quad \xi = \zeta \Sigma$$

et intégrons par rapport à Σ entre zéro et l'infini. On obtient immédiatement

$$(28) \quad \varphi(\zeta) = \frac{\text{Const.}}{(1 + \zeta^2)^2}$$

la formule identique avec (6). Or si l'on veut employer le caractère statistique ζ pour vérifier l'hypothèse H du point de vue de la méthode orthodoxe, on a à calculer la valeur de $\zeta = \zeta_1$ correspondante à des nombres (2) donnés par l'observation, et de calculer la probabilité $P(\zeta_1)$ d'avoir $|\zeta| > |\zeta_1|$

$$(29) \quad P(\zeta_1) = 2 \int_{|\zeta_1|}^{\infty} \varphi(\zeta) d\zeta$$

Cette probabilité ne dépend que de la valeur de ζ_1 , et des valeurs des nombres (10), qui peuvent être choisis arbitrairement dans des limites assez larges. Le résultat est que, étant donnés les nombres d'observations (2) et la valeur $P(\zeta_1)$, donc $|\zeta_1|$, on peut choisir les nombres (10) de telle façon que la valeur du caractère ζ soit égal à ζ_1 . En particulier on peut choisir les nombres (10) pour que

$$(30) \quad \sum_{i=1}^n a_i = 0$$

Supposons que les nombres (2) donnés par l'observation sont tels que z_1 soit extrêmement grand, donc S et $P(z_1)$ — extrêmement petits. En conséquence, si en vérifiant l'hypothèse H on avait employé le caractère z , on serait conduit à la conclusion défavorable pour l'hypothèse H .

Cherchons maintenant à employer le caractère ζ . Au moyen d'un calcul simple on trouve que sous les conditions (11) et (30)

$$(31) \quad \left| \sum_{i=1}^n a_i x_i \right| \leq S \sqrt{n}, \quad \text{donc} \quad |\xi| \leq S$$

Comme d'autre part on a

$$(32) \quad \sum_{i=1}^n x_i^2 = n(\Sigma^2 + \xi^2) = n(S^2 + x_0^2)$$

on trouve sans peine

$$(33) \quad \Sigma \geq |x_0|$$

Il en suit que, si ζ_1 désigne la valeur de ζ correspondant à l'ensemble des nombres (2) considérés, on a

$$(34) \quad |z_1 \zeta_1| \leq 1$$

On voit que lorsque $|z_1|$ croit indéfiniment, $|\zeta_1|$ doit tendre vers zéro et inversement. La conclusion est telle, que dans les cas où l'application du critère z conduit au verdict extrêmement défavorable pour l'hypothèse H , l'application du ζ donne un résultat tout à fait contraire. Le point intéressant est que quel que soit le système des valeurs des nombres a_i , la loi de probabilité de ζ est la même.

Nous voyons donc que la méthode orthodoxe est insuffisante. Si on n'a pas de principe pour choisir entre tous les caractères possibles, qui peuvent être employés pour la vérification des hypothèses, la conclusion doit rester arbitraire. Quand à l'origine d'un tel principe, c'est l'intuition seule qui peut nous en servir. Il est à remarquer qu'entre tous les systèmes possibles des valeurs des a_i , il a été choisi un seul: $a_i = \frac{1}{\sqrt{n}}$, et ce choix, quoique inconscient car Mr. „Student“ n'a pas pensé aux alternatives possibles, a été accepté sans aucun proteste. D'autre part, je ne crois pas que l'application du caractère ζ , pour lequel $\sum_{i=1}^n a_i = 0$ pourrait jouir d'une bienveillance pareille.

En effet, si par exemple les nombres (2) ne différeraient guère de l'unité:

$$1,01; \quad 0,99; \quad 1,02 \text{ etc.}$$

on serait prêt à rejeter l'hypothèse H , que l'espérance mathématique de chacun de ces nombres est égal à zéro. Cette conclusion intuitive est en complet accord avec le résultat d'application du caractère z , quoique le verdict basé sur le caractère ζ soit extrêmement favorable pour l'hypothèse.

Il en suit que quand on vérifie une hypothèse en ne se basant que sur le „bon sens“¹⁾, on utilise quelque autre circonstance, outre la probabilité d'un caractère du fait observé, déterminée par l'hypothèse. Donc, si l'on veut que la sentence citée de Laplace soit justifiée jusqu'au bout, il faut découvrir la circonstance qui sert d'indication pendant un jugement intuitif et l'introduire expressément dans les calculs.

Remarquons encore que la probabilité élémentaire des nombres (2) eux mêmes, définie par l'hypothèse H ne dépend que de la somme

$$(35) \quad \sum_{i=1}^n x_i^2 = \chi^2$$

Or, à toute valeur de χ il correspond des systèmes des valeurs des nombres (2) tels que $z = 0$ et tels que z est extrêmement grand.

Dans le deux cas, comme par exemple

$$(2 \text{ bis}) \quad (a) - 2, -1, 0, 1, 2$$

et (b) — une suite de cinq nombres ayant pour moyenne arithmétique et pour l'écart moyen quadratique

$$(2 \text{ ter}) \quad x_0 = \sqrt{1,9999} \quad \text{et} \quad S = 0,01$$

respectivement la probabilité élémentaire des nombres (2) déterminée par l'hypothèse H , est la même. Dans le premier cas (a) „le bon sens“ ne trouvera pas probablement des raisons suffisantes pour rejeter H , comme invraisemblable. Dans le cas (b) au contraire, la valeur de cette hypothèse va sembler fort douteuse. Pourquoi? Parce que — il me semble — il existent d'autres hypothèses, qui déterminent la probabilité du même fait d'observation bien plus grande, que celle déterminée par H . Et c'est justement la circonstance qui — il me semble — intervient dans tous nos jugements intuitifs des hypothèses.

Nous sommes prêts à accepter toute hypothèse — quelque petite que soit la probabilité du fait observé qu'elle détermine — s'il n'existe pas d'hypothèses alternatives qui déterminent une plus grande et inversement.

¹⁾ „Le calcul des probabilités n'est au fond que le bon sens, réduit au calcul...“ Laplace.

Ce principe peut être mis en formules comme il suit.

Distinguons entre les hypothèses simples et composées. Une hypothèse h est dite simple si elle détermine la probabilité du fait observé, soit E . Une hypothèse H est composée, si elle ne détermine la probabilité de E , que si l'on accepte quelques suppositions supplémentaires. Dans le cas étudié ci dessus, l'hypothèse H , que $a = 0$ était composée par ce que pour déterminer la probabilité du fait observé il nous manquait la valeur de σ . Au contraire, l'hypothèse que p. e. $a = 0$, $\sigma = 1$, est simple.

Désignons par Q l'ensemble des hypothèses, que dans un tel cas pratique on considère comme admissibles. Soit P_h la probabilité du fait observé E déterminé par une hypothèse simple h contenue dans Q , et P_Q — la borne supérieure des nombres P_h .

On appelle la vraisemblance de l'hypothèse simple h la fonction

$$(36) \quad \lambda_h = \frac{P_h}{P_Q}$$

Considérons maintenant une hypothèse composée H . Il est aisé de voir que l'ensemble Q contient un sousensemble Q_H des hypothèses simples qui correspondent à l'hypothèse composée H . Ces hypothèses simples seront celles, qui peuvent être obtenues de H si on lui adjoint des suppositions supplémentaires convenables. Soit P_H la borne supérieure des nombres P_h correspondant à l'ensemble Q_H .

On appelle la vraisemblance d'une hypothèse composée H la fraction

$$(37) \quad \lambda_H = \frac{P_H}{P_Q}$$

Soit h une hypothèse simple. Supposons que λ_h est extrêmement petite. Cela veut dire qu'il existe d'autres hypothèses simples admissibles, qui déterminent les probabilités du fait observé beaucoup plus grandes que celle déterminée par h . Nous constatons donc les circonstances dans lesquelles nous sommes inclinés à rejeter l'hypothèse h .

Il en est de même avec l'expression (37). Soit H est une hypothèse composée, et λ_H — sa vraisemblance. En cas où λ_H est petite on peut dire: si H était vraie, il faudrait qu'une des hypothèses simples, soit h_H , correspondante à H soit vraie. Or quelle que

soit cette hypothèse h_H il existe d'autres, qui ne correspondent pas à H et qui déterminent les probabilités du fait observé beaucoup plus grandes que celle déterminée par h_H .

Si on accepte que l'existence des hypothèses alternatives déterminant les probabilités du fait observé beaucoup plus grandes, que celle déterminée par une hypothèse donnée simple, ou que celles déterminées par des hypothèses simples, correspondantes à une hypothèse composée, est une raison suffisante pour que l'hypothèse considérée devienne suspecte, on doit accepter que les expressions λ_h et λ_H peuvent être employées pour mesurer la confiance intuitive qu'on a pour cette hypothèse.

Pour vérifier une hypothèse on peut donc tout simplement calculer sa vraisemblance λ . Si elle est petite on rejeterait l'hypothèse. Si au contraire λ est proche de l'unité, ou moins, si elle n'est pas trop petite, on constaterait, que les données d'observation ne suffisent pas pour élever de doutes sérieuses envers l'hypothèse considérée.

Il s'agit maintenant de savoir quand une valeur de λ doit être considérée comme „extremement petite“. Certainement c'est une question qui ne peut pas avoir des réponses, qui ne soient pas arbitraires. Mais on doit se rendre compte des conséquences d'un choix de la limite, soit λ_0 , entre les valeurs de la vraisemblance „extremement petites“ et les autres.

Observons qu'en vérifiant les hypothèses on peut commettre les erreurs des deux sortes: (1) on peut accepter une hypothèse fausse et (2) on peut rejeter une qui est vraie. Or la valeur de λ contrôle les erreurs de première sorte. En s'appuyant sur sa valeur nous rejetons l'hypothèse vérifiée, si les données d'observation semblent indiquer, que probablement c'est une autre hypothèse qui est vraie. Il s'agit maintenant de ne pas rejeter trop souvent une hypothèse qui est vraie, quoique les données empiriques indiquent le contraire.

Or, si l'on choisit la valeur λ_0 assez petite, la probabilité pour qu'une hypothèse vraie soit rejetée peut être faite aussi faible que l'on veut.

Les erreurs de deuxième sorte peuvent être d'ailleurs contrôlées au moyen de n'importe quel caractère du fait observé — et cela avec un même succès.

Soit $f(E)$ un caractère du fait observé. h — une hypothèse

simple et $\varphi_h(f)$ — la loi de probabilité de f , déterminée par h . Choisissons maintenant deux nombres $a < b$ de telle manière que

$$(38) \quad I_h(a, b) = \int_a^b \varphi_h(f) df < \varepsilon$$

$\varepsilon > 0$ étant arbitraire. Si l'on convient maintenant de rejeter l'hypothèse h en cas où $a \leq f(E) \leq b$, la probabilité, soit P , pour qu'une hypothèse vraie soit rejetée, sera plus petite que ε . En effet, la probabilité P est égale au produit de la probabilité P_h inconnue, pour que l'hypothèse considérée soit vraie, et de la probabilité, déterminée par cette hypothèse, pour que $a \leq f(E) \leq b$. Or, cette dernière probabilité étant égale à $I_h(a, b)$, on a

$$(39) \quad P = P_h I_h(a, b)$$

Si l'hypothèse vérifiée H est composée, on choisit les nombres a et b de telle façon que la borne supérieure des nombres $I_h(a, b)$ déterminés par les hypothèses simples correspondantes à H soit $< \varepsilon$.

On voit sans peine que la méthode orthodoxe contrôlait les erreurs de deuxième sorte, mais elle ne contrôlait que ceux-là.

Pour contrôler les deux sources d'erreurs on n'a que d'accepter $f(E) = \lambda$. On pose ensuite $a = 0$ et $b = \lambda_0$ et on choisit λ_0 de telle manière que la probabilité déterminée par l'hypothèse simple considérée (ou par chaque hypothèse simple correspondante à l'hypothèse composée qu'on vérifie) pour qu'on ait

$$\lambda \leq \lambda_0$$

soit plus petite que ε . En procédant ainsi on sera sûr de rejeter l'hypothèse vérifiée lorsque les faits d'observation la font suspecte et, en même temps, qu'une hypothèse vraie sera rejetée avec la fréquence moyenne $< \varepsilon$.

Il est intéressant de constater que toutes les méthodes de vérification des hypothèses qui sont entrées en usage commun jusqu'à présent, (la méthode de Mr. „Student“ y compris) sont des conséquences des principes proposés.

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego T. N. W. i Stacja Zoologiczna w Neapolu]

K. Białaszewicz.

Badania nad zjawiskami regulowania składu mineralnego cieczy ciała. I. Doświadczenia nad krabem *Maja squinado* L.
Recherches sur la régulation de la composition minérale dans les liquides organiques. I. Expériences exécutées sur le Crabe, Maja squinado L.

Rękopis nadesłany w dniu 17.V.1930 r.

La tâche de nos recherches a été un essai de constater, si et jusqu'à quel degré les animaux poïkilosmotiques vivant dans l'eau de mer seraient pourvus de la faculté de régler la composition minérale altérée du plasma sanguin et, puis, en quoi consisterait le mécanisme de ce phénomène. Dans ce but nous avons exécuté une série d'expériences sur le Crabe, *Maja squinado* L., consistant dans l'injection dans l'appareil circulatoire de ces animaux, qui ont été laissés dans l'eau de mer, des sels suivants: KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄ et Na₂SO₄. Les constatations comparatives au sujet des concentrations en ions, se manifestant, d'un côté, dans l'hémolymphe et, de l'autre, dans l'urine, chez les animaux en expérience, nous ont amené aux conclusions suivantes:

1°. Le *Maja squinado*, chez qui la composition et la concentration globale des électrolytes dans les liquides du corps sont très proches de celles de l'eau de mer (tabl. X), rend manifeste une faculté fortement accentuée de régler la composition minérale de ces liquides, et notamment: les sels, composants normaux de l'hémolymphe, introduits dans l'appareil circulatoire, disparaissent — après un temps plus ou moins prolongé — complètement du sérum (tabl. II—VIII, fig. 1).

2°. La faculté d'éliminer du plasma sanguin des composés minéraux n'est pas la même par rapport à chaque sel, et notamment: le chlorure de potassium, composé fortement toxique, est

éliminé le plus rapidement (tabl. II), par contre, le sulfate de sodium — le plus lentement (tabl. VI).

3°. Les résultats des expériences, où on avait injecté à l'animal un mélange de deux ou de plusieurs sels, en quantité augmentant leurs concentrations dans l'hémolymphe à un degré approximativement égal (tabl. VII, VIII, IX et fig. 2), ont démontré que ces sels se rangent, au point de vue de la vitesse de leurs disparitions, dans la série suivante: $KCl > CaCl_2 > MgCl_2 > MgSO_4$.

4°. Les glandes antennaires ont la faculté d'éliminer du plasma sanguin le surplus d'électrolytes: ce fait a été prouvé par les expériences, dans lesquelles nous avons analysé les échantillons de l'urine et de l'hémolymphe, recueillis simultanément (tabl. VII et VIII).

5°. Les cations de calcium, de magnésium et les anions des sulfates apparaissent dans l'urine — aussi bien chez les animaux-temoins que chez les animaux en expérience — en concentrations plus fortes que dans l'hémolymphe (tabl. VII et VIII).

6°. Par suite du peu de vitesse du passage d'eau à travers la glande antennaire, — vitesse ne comportant que 3% du poids du corps par 24 h. (tabl. XI), et comme les animaux ne disposent que d'une faculté insignifiante de concentrer certains électrolytes dans l'urine, le dit organe manifeste des traits caractéristiques de l'appareil excréteur qui travaille très lentement. Donc, la glande antennaire chez le *Maja* paraît ne prendre qu'une part très peu importante dans le phénomène d'élimination d'hémolymphe des grandes quantités d'électrolytes, et cela — surtout dans les premiers moments après l'injection.

7°. Il y a des données nous indiquant, que le rôle principal, dans les dits phénomènes, est joué par les tissus du corps, qui saisissent le surplus des composés minéraux introduits dans l'appareil circulatoire et les absorbent.

Jest rzeczą wiadomą, że zwierzęta homojosmotyczne posiadają zdolność sprawnego regulowania nie tylko stężenia, lecz i składu mineralnego cieczy ciała. W zjawiskach przywracania normalnie lub eksperymentalnie zakłóconej równowagi bierze udział cały szereg narządów (nerki, przewód pokarmowy, skóra, płuca, mięśnie), które usuwają z osocza lub dostarczają mu wody i elektrolitów, niezbędnych dla zachowania normalnego składu chemicznego.

Pytanie, czy i w jakim stopniu zwierzęta pojkilosmotyczne, pozbawione mechanizmów regulujących stężenie elektrolitów we krwi, posiadają pomimo to własności chemo-regulacyjne, pozostaje do dnia dzisiejszego niewyjaśnione.

Zagadnieniem tem zajmowano się tylko ubocznie, w związku ze sprawą przepuszczalności dla elektrolitów powierzchni ciała zwierząt niższych. Że i ta kwestja nastęrcza wiele trudności — zarówno w sprecyzowaniu samego pytania, jak i w doświadczalnym jego rozwiązaniu i interpretowaniu wyników — dowodem tego są sprzeczności w poglądach autorów, którzy w tym kierunku prowadzili badania. Gdy mianowicie jedna część badaczy jest zdania, że powierzchnia ciała bezkręgowców morskich w warunkach zwykłych jest zupełnie nieprzepuszczalna dla soli osocza i wody morskiej (BOTTAZZI i ENRIQUES '01, HENRI i LALOU '04, FREDERICQ '04, '22, MACALLUM '04, DEKHUYSEN '21, DUVAL '25), to inni znów interpretują wyniki swoich doświadczeń w znaczeniu całkowitej i w obu kierunkach zaznaczającej się przepuszczalności pokrycia ciała tych zwierząt zarówno dla wody, jak i dla soli (QUINTON '00, '04, BETHE '08, '27). Na stanowisku ostatnio wymienionej ewentualności stoi BETHE w jednej z ostatnich swoich publikacyj ('28), dotyczącej kraba *Carcinus Maenas* i mięczaka *Aplysia punctata*: autor ten stwierdził, że zwierzęta te, trzymane w sztucznej wodzie morskiej, w której jeden z jonów (Ca, K, Mg, Cl, SO₄) był nieobecny lub znajdował się w nadmiarze, ujawniają zmiany zawartości tego jonu we krwi, zachodzące w tym samym co w środowisku kierunku. BETHE ('30, str. 444) jest zdania, że pokrycie ciała bezkręgowców morskich pełni rolę barjery, zapobiegającej utracie jedynie zawartych w ciele koloidów.

W doświadczeniach niniejszych, przeprowadzonych na krabie *Maja squinado* L. postępowano w sposób odmienny: zachowując bez zmiany skład mineralny wody morskiej, w której zwierzęta

stale przebywały, zmieniano drogą zastrzyku skład elektrolitów hemolimfy; porównanie stężeń badanych jonów we krwi i w moczu dało możność wyjaśnienia zachowania się niektórych elektrolitów w cieczach ciała i wyświetlenia roli, jaką w usuwaniu tych składników z krwiobiegu pełnią nerki i tkanki ciała.

Metodyka i technika doświadczeń.

Objekt naszych doświadczeń, *Maja squinado*, jest zwierzęciem, doskonale nadającym się do tego typu badań, zarówno ze względu na wielką odporność na nienaturalne bądź co bądź warunki życia w akwarjach, w których kraby te mogą przebywać całymi miesiącami, jak również ze względu na rozmiary ciała, pozwalające na upust — bez widocznej szkody dla organizmu — znacznych ilości hemolimfy, i z powodu łatwości, z jaką można oddzielić w stanie zupełnie czystym mocz — produkt czynności gruczołów czulkowych.

Zasada doświadczeń polegała na wprowadzeniu do krwiobiegu zwierzęcia określonych ilości soli, będących normalnymi składnikami hemolimfy, i — na jednoczesnym oznaczaniu w różnych odstępach czasu ich stężenia we krwi i w moczu. Poniżej podajemy opis sposobu przygotowywania roztworów i wykonywania iniekcji, ponadto — wskazówki, jakimi kierowaliśmy się przy braniu próbek hemolimfy i moczu oraz przy oznaczaniu w tych cieczach stężenia składników badanych.

Do iniekcji używano następujących soli: KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, i Na₂SO₄. Roztwory iniekcyjne tych substancji przygotowywano w stężeniu prawie izosmotycznym w stosunku do hemolimfy kraba. W przypadkach, gdy chodziło o jednoczesne wprowadzenie dwu lub więcej soli, przygotowywano z roztworów wyjściowych mieszaniny, w których kationy znajdowały się w tym samym w przybliżeniu stosunku, co w hemolimfie normalnej: miało to na celu uzyskanie w pierwszym momencie po zastrzyku jednakowego przyrostu względnego stężeń tych jonów w hemolimfie.

Do doświadczeń brano kraby, od dłuższego czasu — przynajmniej od dwu tygodni — znajdujące się w stanie głodu. Przed zastrzykiem zwierzęta unieruchamiano, kładąc je nawznak: najodpowiedniejszym okazał się sposób opierania pancerza grzbietowego o brzegi odpowiednio wysokich cylindrów szklanych, tak aby zwierzę nie mogło dotykać się końcami odnóży o powierzchnię stołu.

Iniekcję wykonywano zapomocą strzykawki, połączonej cienką, grubościenną i dostatecznie elastyczną rurką gumową z nasadką, na którą nakładano igłę iniekcyjną. Nakłócie robiono u podstawy pierwszego człona jednej z ostatnich par odnóży, przekłuwając cienką błonę chitynową stawu i wprowadzając igłę głęboko do ciała. Roztwór wprowadzano możliwie powoli (5 — 10 min.), naciskając zlekka ruchem obrotowym tłok strzykawki i obserwując uważnie zachowanie się zwierzęcia. Zwykle krab zachowuje się w czasie iniekcji bardzo niespokojnie, poruszając gwałtownie odnóżami

i niejednokrotnie autotomizując kończynę nakłętą lub nawet kilka kończyn. Utrata odnoży nie przeszkadza jednak dalszemu prowadzeniu doświadczenia, albowiem dzięki znanemu mechanizmowi mięśniowemu następuje w kikucie zwanie się rany, które zapobiega dalszemu upływowi krwi.

Po iniekcji zwierzę przenoszono do akwarjum z przepływającą wodą morską, w której pozostawało ono przez cały czas doświadczenia; wyjmowano go stamtąd tylko na czas brania próbek hemolimfy i zbierania moczu.

Hemolimfę brano początkowo zapomocą strzykawki, nakłuwając w różnych miejscach części miękkie ciała. Sposób ten okazał się trudny i niepraktyczny z tego powodu, że igły często zatykały się, zwierzę zaś po pewnym czasie wpadało w stan silnego rozdrażnienia, łamiąc niejednokrotnie igły i autotomizując odnoża. Najprostszym i najprędzej prowadzącym do celu okazał się następujący zabieg, do którego stale uciekał się w późniejszych doświadczeniach.

Kraba umieszczano na brzegu stołu, unieruchamiając go łokciem lewej ręki; w jednym ze zwisających tylnych odnoży szybko odcinano nożyczkami wierzchołek ostatniego człona, odnoże to unieruchomiano w pozycji ku dołowi i podstawiano probówkę, do której sphywała z powierzchni rany potrzebna ilość hemolimfy (5 — 10 cm³). W celu wstrzymania dalszego upływu, odnoże odchyłano ku górze, tak ażeby miejsce zranione znalazło się powyżej poziomu ciała: dla zamknięcia rany do miejsca przeciętego wkładano dobrze dopasowany tampon z plastycznego wosku białego, który na brzegach, w miejscach zetknięcia się z chityną, szczelnie obtapiano małym płomieniem. Po stwardnieniu wosku zwierzę z powrotem przenoszono do akwarjum. Następną próbkę hemolimfy brano z tego samego miejsca, wyjmując szybkim ruchem, z pomocą cienko zakończzonej pincetki, tampon woskowy, i postępując za każdym razem w sposób powyżej opisany. Zabieg ten kraby znoszą bardzo dobrze, autotomizując uszkodzoną kończynę czasami dopiero po paru tygodniach, po wzięciu nieraz kilkunastu próbek krwi.

Zbieranie moczu odbywało się według wskazówek ¹⁾, podanych przez MARCHALA ('92), któremu poraz pierwszy udało się obserwować u *Maja squinado* wyrzucanie moczu z aparatu przykrywkowego („operculum“) oraz powiodło się oddzielić mocz w stanie zupełnie czystym, zdatnym do analizy chemicznej. Sam zabieg, w zasadzie mało skomplikowany, wymaga jednak przestrzegania pewnych ostrożności, mających na celu zachowanie w stanie nienaruszonym wewnętrznej bardzo delikatnej błony aparatu przykrywkowego, w której mieści się otwór moczowy: w razie bowiem uszkodzenia jej mocz może zawierać domieszkę hemolimfy, która nieraz bardzo obficie wypływa ze zranionego miejsca. Postępowaliśmy w ten sposób, że unieruchamialiśmy zwierzę położone na grzbiecie i podnosiliśmy powoli płytkę przykrywkową, chwytając ją ostrożnie lecz mocno rozplą-

¹⁾ „Pour extraire le liquide excrémentiel du *Maja*, il suffit de soulever l'opercule avec une pince, et d'aspirer le liquide avec un compte-gouttes dont l'extrémité étirée à la lampe sera placée au niveau de l'orifice“. MARCHAL, l. c., str. 217.

szeszonymi końcami pincetki w dwu najbardziej zgrubiałych miejscach: przy podnoszeniu płytki trzeba było nieraz przewyciężyć silny opór, stawiany przez mięsień wciągający przykrywkę. Mocz w miarę wypływania z otworu wciągano do tępo zakończonyj pipetki i po napełnieniu jej, przykrywkę za każdym razem opuszczano i wciskano na dawne miejsce, zaś mocz przenoszono do cylindra mierniczego. Zabieg ten, kolejno wykonywany na obu przykrywkach, powtarzano aż do chwili zupełnego ustania wypływu cieczy. Mocz zebrany jest zupełnie przezroczysty i zwykle bezbarwny, posiada jednak czasami kolor zlekką żółtawy, który po pewnym czasie przybiera odcień ceglasty. Przeznaczony do analizy mocz przechowywano, dodając doń kilka kropli chloroformu.

Mocz bezpośrednio po zebraniu mógł być użyty do analizy chemicznej, próbki natomiast hemolimfy należało odbiałczyć. Najodpowiedniejszym odczynnikiem okazał się kwas trójchlorooctowy (12%), który (1:1) wlewano kroplami do hemolimfy, ciągle mieszając; po upływie kilku godzin osad białka odwirowywano, zaś ciecz klarowną zlewano do probówek, w których przechowywano ją do analizy.

Ponieważ w badaniach niniejszych chodziło nam o porównanie stężeń elektrolitów, znajdujących się w stanie zjonizowanym w hemolimfie i w moczu, przeto było rzeczą ważną przekonanie się, jakie zmiany w rozmiarze cząsteczek elektrolitów między fazą koloidalną i wodną hemolimfy powoduje odczynnik, używany do odbiałczania.

Tab. I przedstawia wynik jednego z doświadczeń, w których zmiany te usiłowano ustalić. W tym celu większą ilość świeżo zebranej hemolimfy, pochodzącej od normalnego zwierzęcia, rozdzielano na trzy porcje: w części pierwszej porcji oznaczano chlor metodą VOLHARDTA, resztę zaś po spopieleniu kwasem azotowym na gorąco (BIAŁASZEWICZ '26, 27a) rozpuszczano w objętości wody, równej wziętej do spopielenia objętości hemolimfy; z drugiej porcji przygotowywano odpowiednią ilość ultraprzesącza; trzecią natomiast porcję odbiałczano kwasem trójchlorooctowym w sposób opisany powyżej. W trzech tych roztworach analizę badanych składników mineralnych wykonywano jednocześnie, w jednej serji oznaczeń. Objętość fazy koloidalnej w hemolimfie (na podstawie stężenia chloru) i procentową ilość związanych koloidalnie składników obliczono według wskazówek, podanych w jednej z prac poprzednich (BIAŁASZEWICZ '27 b, 28 a).

Wyniki, podane w tabeli, wskazują wyraźnie na fakt wiązania się z białkami hemolimfy znaczniejszych ilości magnezu (12.8%) i wapnia (16.4%), mniejszych natomiast — potasu (3.5%). Ciekawem jest, że całkowita ilość siarki, której około 88% występuje pod postacią związków mineralnych, znajduje się w cieczy międzycząstkowej w stanie niezwiązanym.

Jak należało przewidywać, pod wpływem kwaśnego odczynnika odbiałczającego znaczna część katjonów, związanych z białkami hemolimfy, przechodzi do roztworu, zwiększając ich koncentrację w płynie, odwirowanym po odbiałczeniu. W doświadczeniu omawianem stężenie to wzrosło o 12.4% dla wapnia i o 6.7% dla magnezu, wobec prawie niezmiennego stężenia potasu. Wypływa stąd ważny dla krytycznej oceny naszych wyników fakt, że znajduwane w płynie odbiałczonym stężenie

nia wapnia i magnezu są wyższe od rzeczywistych, t.j. od stężeń, w jakich te jony występują w cieczy międzycząstkowej hemolimfy.

Tabela I.

Rozmieszczenie elektrolitów w hemolimfie *Maja squinado* i wpływ odbiałczania kw. trójchlorooctowym na skład mineralny cieczy odwirowanej.

Répartition des électrolytes dans l'hémolymphe de Maja squinado et influence de la précipitation des protéines avec l'acide trichloroacétique sur la composition du liquide centrifugé.

Składniki <i>Composants</i>	Popiół <i>Cendres</i>	Ultraprzęsącz <i>Liquide ultra- filtré</i>	Ilości składników, związane z fazą ko- koloidalną	Ciecz odwirowana, po odbiałczeniu kw trójchlorooctowym
			<i>Quantités des com- posants liées à la phase colloïdale</i>	<i>Liquide centrifugé après la précipita- tion des protéines par l'acide trichlo- roacétique</i>
	mg/cm ³	mg/cm ³	%	mg/cm ³
Cl	19.83	23.22	0	22.32
K	0.508	0.574	3.8	0.568
Ca	0.519	0.507	16.4	0.570
Mg	1.582	1.612	12.8	1.720
S (całkow.) <i>(total)</i>	0.916	1.072	0	—
S (miner.) <i>(minéral)</i>	—	0.939	—	0.929

W cieczach badanych, t. j. w moczu i hemolimfie, oznaczaliśmy następujące składniki: K, Ca, Mg, Cl i S. Pierwsze cztery pierwiastki oznaczaliśmy metodami mikrochemicznymi, biorąc do każdego z równoległych oznaczeń po 0.5 cm³ roztworu nierozcieńczonego, a mianowicie: potas — metodą KRAMERA i TISDALLA ('21), po odpędzeniu śladów amonjaku; wapń — według DE WAARDA ('19) i HECHTA ('23); magnez — metodą BELLA i DOISY'EGO ('21) oraz BRIGGSA ('22), według wskazówek, podanych przeze mnie ('26, '27 a); chlor — według WHITEHORNA ('21). Siarkę oznaczano wagowo jako BaSO₄, biorąc do analizy większe objętości cieczy badanych (od 2.5 do 5.0 cm³). We wszystkich analizach ściśle przestrzegano zasady jednoczesnego oznaczania w płynie badanym i roztworze wzorcowym.

Część doświadczalna.

Poniżej podajemy opis doświadczeń nad zachowaniem się w krwiobiegu oddzielnych soli i ich mieszanin oraz wyniki, dotyczące roli gruczołu czułkowego w regulowaniu składu mineralnego hemolimfy.

1. Wstrzykiwanie oddzielnych soli.

W doświadczeniach tych chodziło przede wszystkim o ustalenie wielkości dawek maksymalnych, które nie wywoływałyby zbyt gwałtownych, nieodwracalnych zaburzeń w organizmie.

Po szeregu prób wstępnych okazało się, że największe ostrożności należy zachowywać w przypadku soli potasowych (KCl), w stosunku do których zwierzęta są szczególnie wrażliwe. Jako maksimum, po którego zastrzyku kraby wracają — wprawdzie po dłuższym czasie — do stanu normalnego, ustaliliśmy dawkę 0.28 g K na kilogram wagi zwierzęcia (por. dośw. № X, tab. II), t. j. ilość, która w pierwszej godzinie po iniekcji powiększa prawie dwukrotnie stężenie jonów potasowych w hemolimfie.

Bardzo daleko posunięta ostrożność przy iniekcji innych soli (CaCl_2 , MgCl_2 , MgSO_4 i Na_2SO_4) okazała się zbyteczna. Stwierdziliśmy np., że zwierzęta zupełnie dobrze znoszą większe ilości soli magnezowych (MgCl_2 , MgSO_4), zwiększające o 200% i więcej stężenie tych katjonów w hemolimfie normalnej; w tym samym stosunku można było osiągnąć przyrost jonów wapniowych, nie wywołując gwałtownych reakcji ze strony zwierzęcia. W większości jednak doświadczeń unikano zbyt dużych dawek, mogących spowodować śmierć zwierzęcia, i starano się nie przekraczać dwukrotnego zwiększenia stężeń jonów badanych w hemolimfie.

Zachowanie się zwierząt po zastrzyku tych soli jest różne i dosyć charakterystyczne.

Bardzo mało wrażliwe są kraby na iniekcję CaCl_2 , a zwłaszcza — Na_2SO_4 . Reakcja zwierząt w tych razach ogranicza się do ogólnego zaniepokojenia, wyrażającego się wzmożonymi ruchami odnóży. Po zastrzyku CaCl_2 — przynajmniej w ilościach przez nas stosowanych — ogólny stan zwiększonej pobudliwości trwa jeszcze przez pewien czas po zabiegu, lecz już po upływie 2 — 3 godzin zwierzę wraca do normy.

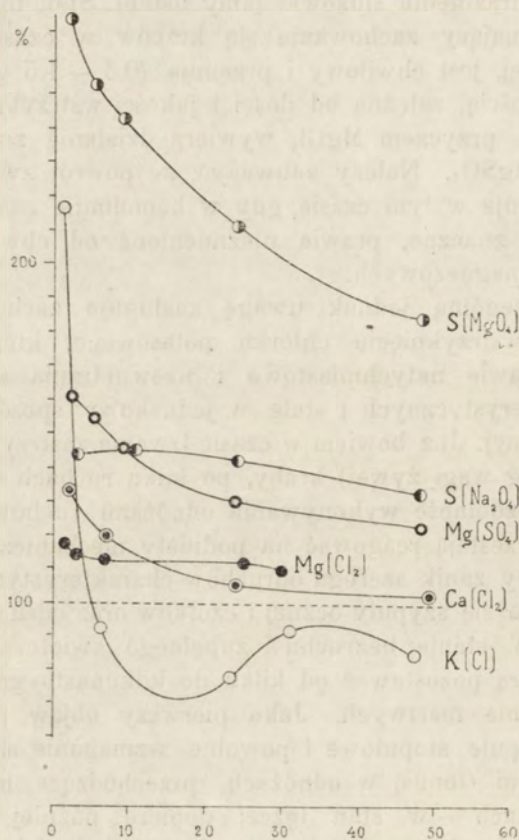
Zgoła odmiennie przedstawia się reakcja krabów na wprowadzenie soli magnezowych. Zwierzę, które w pierwszych chwilach zastrzykiwania wykazuje, jak zwykle, wzmożoną pobudliwość, już po upływie kilku minut uspakaja się, wykonywując

odnóżami coraz to powolniejsze ruchy. Występuje wyraźnie stan ogólnego odurzenia i stopniowego zanikania odruchów na podrażnienia mechaniczne: a więc ustaje przedewszystkiem ruch cofania się szypuły ocznej, następnie — odruch cofania się antenul i wreszcie — odruch chwytny żuwaczek, występujący normalnie po zadrażnieniu śluzówki jamy ustnej. Stan ten, całkowicie przypominający zachowanie się krabów w czasie narkozy chloroformowej, jest chwilowy i przemija (0.5 — 1.5 godzin) bez śladu z szybkością, zależną od ilości i jakości wstrzykniętych soli magnezowych, przyczem $MgCl_2$ wywiera działanie znacznie silniejsze, niż $MgSO_4$. Należy zauważyć, że powrót zwierzęcia do normy następuje w tym czasie, gdy w hemolimfie znajdują jeszcze się dość znaczne, prawie niezmienione od chwili iniekcji ilości jonów magnezowych.

Na szczególną jednak uwagę zasługuje zachowanie się krabów po wstrzyknięciu chlorku potasowego, którego działanie jest prawie natychmiastowe i uzewnętrznia się w szeregu charakterystycznych i stale w jednakowy sposób przebiegających reakcyj. Już bowiem w czasie trwania zastrzyku (0.18 — 0.28 g K na kg wagi żywej) kraby, po kilku ruchach obronnych, szybko tracą zdolność wykonywania odnóżami ruchów skoordynowanych, przestają reagować na podniety mechaniczne i ujawniają całkowity zanik szeregu odruchów charakterystycznych, jak odruch cofania się szypuły ocznej i czułków oraz odruch chwytny żuwaczek. W stanie bezruchu i zupełnego zwiótczenia mięśni zwierzęta mogą pozostawać od kilku do kilkunastu godzin, sprawiając wrażenie martwych. Jako pierwszy objaw powrotu do normy występuje stopniowe i powolne wzmaganie się trwałego napięcia mięśni (tonus) w odnóżach, przechodzące nieraz — po dużych dawkach — w stan tężca; dopiero później zaczynają ujawniać się odruchy, w kolejności odwrotnej do ich zanikania: przedewszystkiem więc wraca odruch antenul, potem — szypuły ocznej, następnie — ruchy żuwaczek i głaszczek, ruchy oddechowe szczękonoóg i wreszcie — ruchy dowolne kończyn tułowiowych. Przez cały szereg dni po iniekcji kraby zachowują się jednak niezupełnie normalnie: wyraża się to w małej ruchliwości zwierząt, powolnem oddziaływaniu na podniety i zupełnem niereagowaniu na podawany pokarm. Jest rzeczą charakterystyczną, że stan obniżonej pobudliwości trwa jeszcze przez długi

czas po osiągnięciu normalnego stężenia jonów potasowych w hemolimfie.

Wyniki najbardziej typowych doświadczeń, w których po iniekcji soli oznaczaliśmy w różnych odstępach czasu stężenia w hemolimfie wprowadzonych w nadmiarze jonów, zostały przed-



Rys. 1. Stężenia składników iniekowanych w hemolimfie, wyrażone w procentach ich wartości początkowych. Według wyników doświadczeń, przedstawionych w tabelach II — VI.

Fig. 1. Concentrations des composants injectés dans l'hémolymph, exprimées en % de leurs valeurs initiales. D'après les résultats des expériences, présentés aux tableaux II — VI.

stawione w tabelach II — VI. Stężenia te wyrażono w mg w jednym centymetrze sześciennym hemolimfy oraz — dla łatwiejszego porównania szeregów liczb — obliczono je również w procentach stężenia początkowego, t. j. w odsetkach ich stężenia

w hemolimfie przed zastrzykiem. W niektórych tabelach (II, IV i V), oprócz wyników oznaczeń jonów wprowadzonych do krwiobiegu, podano również stężenie innych składników nieorganicznych hemolimfy. Ponadto — główne rezultaty tych doświadczeń zostały przedstawione graficznie na rys. 1 w postaci krzywych, wyrażających względne zmiany stężeń poszczególnych jonów w hemolimfie, w różnych odstępach czasu, w przeciągu 48 godzin po iniekcji.

Przebieg tych krzywych ujawnia szereg cech charakterystycznych badanego zjawiska.

Przedewszystkiem — ze wszystkich w tym kierunku przeprowadzonych doświadczeń wynika zgodnie, że eksperymentalnie zmieniony normalny stosunek elektrolitów w hemolimfie zostaje całkowicie przywrócony po krótszym lub dłuższym przeciągu czasu.

Na podstawie doświadczeń, w których — oprócz jonów wprowadzonych — oznaczaliśmy również inne składniki elektrolityczne hemolimfy, możemy ponadto twierdzić, że zwiększenie koncentracji jednego ze składników nie wpływa w sposób bardziej wybitny na ilościowe ustosunkowanie się składników pozostałych. Zmiany, te o ile zachodzą, nie przekraczają kilku lub kilkunastu procentów stężenia normalnego. Tak np. po iniekcji KCl (tab. II), MgCl₂ (tab. IV) i MgSO₄ (tab. V i VIII) stale stwierdzamy przyrósł stężenia wapnia, który w przypadku krańcowym nie przekracza 34%; iniekcja MgSO₄ (tab. V) lub mieszaniny tej soli z MgCl₂ (tab. VIII) spowodowała w dwu przypadkach ubytek jonów potasowych, wynoszący odpowiednio 12 i 20% stężeń początkowych.

Wyrównywanie zmian w składzie mineralnym hemolimfy zachodzi więc głównie dzięki eliminowaniu z krwiobiegu tych jonów, które zostały wprowadzone w nadmiarze: stężenie bowiem wszystkich bez wyjątku soli (KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, Na₂SO₄) wykazuje najwyższą wartość w pierwszych momentach po iniekcji, następnie — stopniowo i prawidłowo zmniejsza się i po pewnym, charakterystycznym dla każdej soli przeciągu czasu, dochodzi do wartości początkowej, właściwej stężeniu tej soli w hemolimfie normalnej. Prawidłowość w przebiegu krzywych, odnoszących się do poszczególnych soli, — z wyjątkiem może krzywej Na₂SO₄ —

Tabela II.

Stężenie w hemolimfie składników po wstrzyknięciu roztworu KCl (5.5 cm³), zawierającego 216 mg K. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 4) = 766 g. Początek dośw. 7. I. 1929. Dośw. № X.
Concentration de l'hémolymphe en composants minéraux après l'injection de la solution de KCl (5.5 cm³), contenant 216 mg de K. Poids du corps de l'animal (№ 4) = 766 gr. Début de l'expérience (№ X): 7. I. 1929.

№ próbki hemolimfy № d'échantillons de l'hémolymphe	Czas od chwili wstrzyknięcia Temps écoulé après l'injection h	K		Ca mg/cm ³	Mg mg/cm ³
		mg/cm ³	w procentach stężenia począt. en % de la concentrat. initiale		
1	0	0.618	100	0.459	1.480
2	1	1.336	216	0.521	1.414
3	6.2	0.578	93	0.520	1.393
4	23.5	0.491	79	0.548	1.378
5	31	0.570	92	—	—
6	47.5	0.525	85	—	—
7	73	0.484	78	—	—

wskazywałyby na istnienie — w pewnym oczywiście przybliżeniu — zależności prostej między szybkością znikania tych soli z krwiobiegu a ich aktualną w hemolimfie nadwyżką.

Tabela III.

Stężenie wapnia w hemolimfie po wstrzyknięciu roztworu CaCl₂ (5.5 cm³), zawierającego 109 mg Ca. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 2) = 766 g. Początek dośw. 4. I. 1929, 11⁰⁰h. Dośw. № IX.
Concentration de l'hémolymphe en calcium après l'injection de la solution de CaCl₂, contenant 109 mgr. de Ca. Poids du corps de l'animal (№ 2) = 766 gr. Début de l'expérience (№ IX): 4. I. 1929, 11⁰⁰h.

№ próbki hemolimfy № d'échantillons de l'hémolymphe	Czas od chwili wstrzyknięcia Temps écoulé après l'injection h	Ca	
		mg/cm ³	w proc. stężenia początkowego en % de la concentrat. initiale
1	0	0.415	100
2	1.7	0.557	134
3	7	0.497	120
4	23.7	0.443	107
5	49	0.430	103
6	72	0.457	110

Poza temi prawidłowościami ogólnymi, proces eliminowania poszczególnych soli z krwiobiegu ujawnia jednak pewne cechy swoiste.

Jak już wspomnieliśmy, Na₂SO₄ zachowuje się w hemolimfie w sposób pod pewnymi względami odmienny. Sól ta, nie wy-

wołując w zwierzęciu żadnych zmian anormalnych, przez bardzo długi czas pozostaje w krwiobiegu w ilości prawie niezmienionej. W doświadczeniu № 6 (tab. VI) po wstrzyknięciu krabowi, ważącemu 1411 g, ilości siarczanu sodowego, zawierającej 287 mg S, w ciągu pierwszej doby po iniekcji stwierdzono przyrost siarki nieorganicznej, wynoszący 45% po upływie 3.5 godzin, 48% — po 9 godz. i 42% — po 24 godz., czyli wartości prawie identyczne; po upływie 120 godz. nadwyżka siarki w hemolimfie wynosiła jeszcze 34%¹⁾.

Tabela IV.

Stężenie w hemolimfie magnezu i wapnia po wstrzyknięciu roztworu $MgCl_2$ (11 cm^3), zawierającego 211 mg Mg. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 3) = 2090 g, Początek doświadczenia 31. XII. 1928, 10⁰⁰ h. Doświadczenie № VIII.

Concentration de l'hémolymphe en magnésium et en calcium, après l'injection de la solution de $MgCl_2$ (11 cm^3), contenant 211 mgr. de Mg. Poids du corps de l'animal (№ 3) = 2090 gr. Début de l'expérience (№ VIII): 31.XII.1928, 10⁰⁰ h.

№ próbki hemolimfy <i>№ d'échantillons de l'hémolymphe</i>	Czas od chwili wstrzyknięcia <i>Temps écoulé après l'injection</i>	Mg		Ca mg/cm ³
		mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego <i>en % de la concentration initiale</i>	
	h		%	
1	0	1.361	100	0.411
2	1.2	1.618	119	0.418
3	3.2	1.572	115	0.422
4	7	1.554	114	0.429
5	23.5	1.538	113	0.422
6	30	1.506	110	0.428

Znacznie szybciej, aczkolwiek dosyć jeszcze powoli w porównaniu z innymi wstrzykiwaniami solami (KCl , $CaCl_2$), następuje regulacja normalnego składu hemolimfy po iniekcji soli magnezowych ($MgCl_2$ i $MgSO_4$). W obu przypadkach stężenie zarówno katjonów Mg^{++} , jak i anjonów SO_4^{--} ujawnia już od pierwszych momentów po iniekcji tendencję wyraźnie zniżkową, aczkolwiek intensywność znikania tych jonów z krwiobiegu jest dosyć niewielka. Tak np. w ciągu pierwszej doby po wstrzyknięciu $MgCl_2$ (tab. IV) nadwyżka stężenia magnezu zmniejszyła się z 19 do 13%, zaś po wprowadzeniu $MgSO_4$ (tab. V) — z 61 do 31%, natomiast nadwyżka siarki mineralnej uległa zmniejszeniu — z 174 do 111%.

¹⁾ Fakt ten mógłby posłużyć jako punkt wyjścia do opracowania metody oznaczania ilości hemolimfy w ciele krabów.

O wiele sprawniej radzi sobie organizm krąba z nadmiarem jonów wapniowych i potasowych, które zwykle już w ciągu pierwszego dnia doświadczenia całkowicie znikają z hemolimfy. Na szczególną jednak uwagę pod tym względem zasługują sole potasowe ze względu na ich natychmiastowe i niezmiernie silnie trujące działanie na organizm. Wprowadzając małe ilości tych soli (do 0.05 g K na kg wagi żywej), w hemolimfie, wziętej wkrótce po iniekcji, albo wcale nie stwierdzamy zmian lub też obserwujemy bardzo nieznaczny i szybko przemijający przyrost stężenia jonów potasowych, pomimo że objawy zatrucia zwierzęcia wy-

Tabela V.

Stężenie w hemolimfie składników mineralnych po zastrzyknięciu roztworu $MgSO_4$ (8.4 cm³), zawierającego 291 mg Mg i 383 mg S. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 7) = 921 g. Początek dośw. 14.1.1929, 11⁰⁰ h. Dośw. № XII.

Concentration de l'hémolymphe en composants minéraux après l'injection de la solution de $MgSO_4$ (8.4 cm³), contenant 291 mgr. de Mg et 383 mgr. de S. Poids du corps de l'animal (№ 7) = 921 gr. Début de l'expérience (№ XII): 14.1.1929, 11⁰⁰ h.

№ próbki hemolimfy <i>№ d'échantillons de l'hémolymphe</i>	Czas od chwili wstrzyknięcia <i>Temps écoulé après l'injection</i>	Mg		S		Ca	K
		mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego <i>en % de la concentration initiale</i>	mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego <i>en % de la concentration initiale</i>		
			h		%		
1	0	1.434	100	0.714	100	0.454	0.522
2	2	2.314	161	1.960	274	0.486	0.493
3	5	2.232	156	1.801	252	0.487	0.487
4	9	2.222	146	1.746	244	0.492	0.460
5	24	1.880	131	1.508	211	0.515	0.587
6	48	1.766	123	1.304	183	0.522	0.539

stępują dosyć intensywnie. Znaczniejsze przyrosty stwierdzamy dopiero wtedy, gdy ilość wprowadzonego KCl jest odpowiednio duża i gdy pierwsza próbka hemolimfy została wzięta możliwie szybko po iniekcji. Zachowując odpowiednie warunki doświadczenia i pobierając próbki hemolimfy w krótkich odstępach czasu, możemy zauważyć, że jony potasowe należą do tych składników mineralnych hemolimfy, które — działając niezmiernie trująco na organizm — zostają w najkrótszym czasie usuwane z krwiobiegu. W doświadczeniu, podanem w tab. II (por. rys. № 1), widzimy, że po upływie 6.2 godz. od chwili zastrzyku, zwiększającego w momencie pobierania pierwszej próbki (1 godz.) zawartość potasu w hemolimfie do 216%, został elimi-

nowany nie tylko cały nadmiar tego jonu, ale nawet prócz tego pewna ilość, powodująca obniżenie stężenia potasu w hemolimfie do 93% początkowej wartości.

Zjawisko bardzo szybkiego znikania soli potasowych z hemolimfy, jakó procesu o charakterze regulacyjnym, jest tem ciekawsze, że przez organizm krabów, będących zwierzętami mięsożernymi, w normalnych warunkach odżywiania przepływają znaczne ilości soli potasowych, pobieranych wraz z pokarmem.

Tabela VI.

Stężenie w hemolimfie siarki nieorganicznej po wstrzyknięciu roztworu Na_2SO_4 (11 cm^3), zawierającego 287 mg S. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 1) = 1411 g. Początek doświadczenia 28.XII. 1928, 11⁰⁰ h. Doświadczenie № VI.

Concentration de l'hémolymphé en soufre inorganique après l'injection de la solution de Na_2SO_4 (11 cm^3), contenant 287 mgr. de S. Poids du corps de l'animal (№ 1) = 1411 gr. Début de l'expérience: 28.XII.1928. Expérience № VI.

№ próbki hemolimfy № d'échantillons de l'hémolymphé	Czas od chwili wstrzyknięcia Temps écoulé après l'injection h	S	
		mg/ cm^3	w proc. stężenia początkowego en % de la concentrat. initiale %
1	0	0.820	100
2	3.5	1.191	145
3	9	1.215	148
4	24	1.167	142
5	48	1.194	146
6	120	1.094	134

Doświadczenia typu omawianego w niniejszym rozdziale dają również możność zorientowania się we względnej szybkości eliminowania z krwiobiegu nadmiaru poszczególnych jonów. Jeżeli mianowicie za miarę tej szybkości przyjmiemy czas, w ciągu którego $\frac{1}{3}$ część nadwyżki znika z hemolimfy, to interpolując poszukiwane wartości z przebiegu krzywych rys. 1, otrzymamy liczby następujące:

KCl	ca 1.5 godz.
CaCl_2	" 15 "
MgSO_4	" 22 "
MgCl_2	" 23 "
Na_2SO_4	> 120 "

Na dwu krańcach tego szeregu znajduje się, z jednej strony, chlorek potasu, jako związek, ulegający stosunkowo najszybszej

eliminacji, z drugiej zaś — siarczan sodowy, który najdłużej z pośród badanych soli pozostaje w cieczach krążących kraba.

2. Wstrzykiwanie mieszanin soli.

Doświadczenia powyższe nad zachowaniem się oddzielnych soli w cieczach ciała nie dają dostatecznie pewnej podstawy do wyprowadzenia wniosków wiążących, dotyczących szybkości względnej regulowania zmienionego składu mineralnego. Doświadczenia te bowiem były prowadzone na różnych osobnikach niejednakowej płci i masy ciała, znajdujących się w różnych okresach głodu, przyczem zwierzętom wprowadzono do krwiobiegu niejednakowe ilości soli, w różnym stopniu zwiększające początkowe stężenie badanych jonów w hemolimfie.

W celu usunięcia różnic indywidualnych i ujednostajnienia innych warunków eksperymentu postępowaliśmy w dalszych naszych poszukiwaniach w sposób następujący:

W każdym doświadczeniu wprowadzano do krwiobiegu mieszaninę kilku soli, wstrzykując ich roztwór stężony, który zawierał katjony w tym samym w przybliżeniu stosunku, w jakim one występują w normalnej hemolimfie kraba. W ten sposób osiągnano w pierwszych chwilach po iniekcji jednakowy przyrost procentowy stężenia badanych jonów w hemolimfie. W razie jednakowej szybkości eliminowania wprowadzonych jonów, krzywe, wyrażające procentowe zwiększanie ich stężenia w zależności od czasu, powinnyby się nawzajem przykrywać. W przeciwnym razie z wielkości wzajemnego odchylenia tych krzywych od siebie, spodziewaliśmy się osiągnąć dokładniejsze wskazówki, odnoszące się do względnej szybkości, z jaką jony wprowadzone znikają z krwiobiegu. Wstrzykując w szeregu doświadczeń, prowadzonych na różnych osobnikach, mieszaniny soli o jednym wspólnym jonie, można było ustalić szereg, wyrażający względną szybkość, z jaką te sole są eliminowane z hemolimfy.

Doświadczeń o typie powyżej opisanym przeprowadziliśmy kilka, z których podajemy dwa najbardziej kompletne i udane. W obu doświadczeniach wspólnym jonem mieszanin iniekowanych był magnez, wprowadzony jako $MgCl_2$.

W pierwszym doświadczeniu do iniekcji użyto roztwór $KCl + CaCl_2 + MgCl_2$, zawierający następujące ilości katjonów:

Mg	12.69 mg/cm ³
Ca	4.12 " "
K	4.89 " "

czyli w stosunku 1 : 0.32 : 0.39, gdy w hemolimfie zwierzęcia przed iniekcją (tab. VII) znaleziono następujące ilości tych jonów:

Mg	1.471 mg/cm ³
Ca	0.523 " "
K	0.704 " "

t. j. w stosunku wzajemnym, jak 1 : 0.35 : 0.48, różniącym się w porównaniu z roztworem iniekcyjnym głównie większą (o ca. 24%) zawartością jonów potasowych.

Tabela VII.

Stężenie potasu, wapnia, magnezu i chloru w hemolimfie po wstrzyknięciu roztworu KCl + CaCl₂ + MgCl₂ (40 cm³), zawierającego 196 mg K, 165 mg Ca i 508 mg Mg. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 9) = 1498 g. Początek doświadczenia 25. I. 1929, 10³⁰ h. Doświadczenie № XV.
Concentration de l'hémolymphe en potassium, en calcium, en magnésium et en chlore, après l'injection de la solution de KCl + CaCl₂ + MgCl₂ (40 cm³), contenant 196 mgr. de K, 165 mgr. de Ca et 508 mgr. de Mg. Poids du corps de l'animal (№ 9) = 1498 gr. Début de l'expérience (№ XV): 25. I. 1929, 10³⁰ h.

№ obserwacji № observation	Czas od wstrzyknięcia Temps écoulé après l'injection	H (hemolimfa — hémolymphe) M (mocz — urine)	K		Ca		Mg		Cl
			mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego en % de la concentration initiale	mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego en % de la concentration initiale	mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego en % de la concentration initiale	
				%		%		%	
1	0	H	0.704	100	0.523	100	1.471	100	22.44
		M	0.562	—	0.626	—	1.933	—	21.60
2	1	H	0.910	129	0.776	148	2.528	172	23.91
		M	0.562	—	0.738	—	2.405	—	—
3	4.5	H	0.506	72	0.542	104	2.340	159	23.06
		M	0.473	—	0.592	—	2.216	—	—
4	8.5	H	0.478	63	0.480	92	2.164	147	23.52
		M	0.481	—	0.507	—	2.314	—	—
5	23.5	H	0.548	78	0.480	92	2.119	144	22.44
		M	0.451	—	0.507	—	2.038	—	22.63
6	32.5	H	0.537	76	0.476	91	2.016	137	22.75
		M	0.451	—	0.496	—	2.064	—	22.75
7	71.5	H	0.495	70	0.472	90	1.896	129	22.48
		M	0.501	—	0.503	—	2.022	—	21.97

W drugim z przytoczonych doświadczeń (tab. VIII) wstrzyknięto roztwór MgCl₂ + MgSO₄, który zawierał:

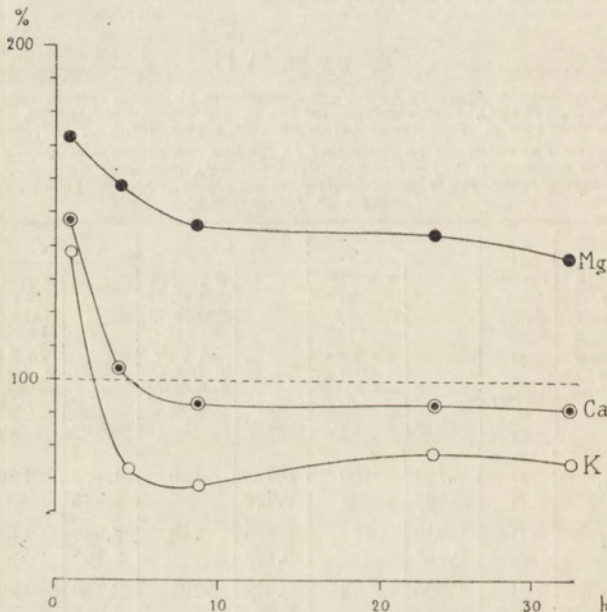
Mg 24.52 mg/cm³
 S 16.14 „ „ „

zatem w stosunku Mg do S, jak 1:0.65, gdy normalna hemolimfa kraba eksperymentalnego wykazała zawartość tych jonów:

Mg 1.424 mg/cm³
 S 0.840 „ „

o stosunku magnezu do siarki, jak 1:0.59.

W doświadczeniu, w którym roztworem iniekcyjnym była mieszanina chlorków (tab. VII, rys. 2), analiza już pierwszej próbki hemolimfy, wziętej po upływie jednej godziny po zastrzyku,



Rys. 2. Stężenie potasu, wapnia i magnezu w hemolimfie, wyrażone w procentach ich wartości początkowych, po iniekcji roztworu KCl + CaCl₂ + MgCl₂. Według danych tabeli VII.

Fig. 2. Concentrations de potassium, de calcium et de magnésium dans l'hémolymph (exprimées en % de leurs valeurs initiales), après l'injection de la solution des KCl + CaCl₂ + MgCl₂. D'après les données du tableau VII.

ujawniła znacznie odbiegający od normy stosunek ilościowy wprowadzonych katjonów: mianowicie, zamiast spodziewanego prawie jednakowego przyrostu stężenia tych jonów, zwiększanie się koncentracji magnezu wynosiło 72%, wapnia — 48%, zaś potasu — zaledwie 29%. Różnice te jeszcze mocniej zaznaczyły się

w następnych godzinach: gdy po upływie 8.5 godzin w hemolimfie stwierdzono jeszcze znaczny nadmiar (47%) magnezu, to zawartość dwu innych jonów spadła w tym czasie poniżej wartości początkowej, wynosząc dla wapnia 92%, zaś dla potasu — zaledwie 68% stężenia tych jonów przed zastrzykiem.

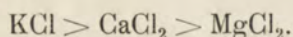
Tabela VIII.

Stężenie składników mineralnych w hemolimfie po wstrzyknięciu roztworu $MgCl_2 + MgSO_4$ (25.7 cm³), zawierającego 620 mg Mg i 415 mg S. Ciężar ciała zwierzęcia (№ 7a) = 1217 g. Początek doświadczenia (№ XIII) 17.I.1929, 11¹⁵ h.

Concentration de l'hémolymphe en composants minéraux après l'injection de la solution de $MgCl_2 + MgSO_4$ (25.7 cm³), contenant 620 mgr. de Mg et 415 mgr. de S. Poids du corps de l'animal (№ 7a) = 1217 gr. Début de l'expérience (№ XIII): 17.I.1929, 11¹⁵ h.

№ obserwacji № d'observation	Czas od chwili wstrzyknięcia Temps écoulé après l'injection h	H (hemolimfa — hémolymphe) M (mocz — urine)	Mg		S		K	Ca	Cl
			mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego en % de la concentration initiale	mg/cm ³	w procentach stężenia początkowego en % de la concentration initiale			
1	0	H	1.424	100	0.840	100	0.668	0.550	22.20
		M	1.725	—	1.222	—	0.529	0.561	22.20
2	1.7	H	3.366	238	2.065	246	0.542	0.504	23.43
		M	3.388	—	2.215	—	0.509	0.496	—
3	3.2	H	2.990	211	1.834	218	0.626	0.527	22.04
		M	3.144	—	2.197	—	0.507	0.546	—
4	10.7	H	2.544	179	1.552	188	0.628	0.552	21.90
		M	2.748	—	1.832	—	0.537	0.561	—
5	23.5	H	2.180	153	1.368	163	0.618	0.546	22.30
		M	2.458	—	1.521	—	0.558	0.561	22.66
6	144.0	H	1.596	112	0.961	114	0.735	0.538	19.34
		M	1.598	—	1.117	—	0.571	0.542	19.49

Przebieg znikania z hemolimfy tych trzech katjonów ilustruje rys. 2, przedstawiający w różnych odstępach czasu ilości Mg^{++} , Ca^{++} i K^+ , wyrażone w procentach ich stężeń w hemolimfie normalnego kraba. Stosunek wzajemny tych krzywych dowodzi, że szybkość eliminowania iniekowanych soli zmniejsza się w następującym porządku:



W drugim doświadczeniu tego samego typu (tabl. VIII), w którym iniekowano jednocześnie $MgCl_2$ i $MgSO_4$, w próbce hemolimfy, pobranej po 1.7 godzinach, znaleziono 3.366 mg Mg i 2.065 mg S

w jednym cm^3 , wobec 1.424 mg Mg i 0.840 mg S w tej samej objętości hemolimfy, wziętej przed iniekcją. Stężenie tych jonów w jednym cm^3 hemolimfy zwiększyło się zatem o 1.942 mg Mg i 1.225 mg S, czyli w stosunku 1 : 0.63. Wobec tego, że jony te znajdowały się w płynie iniekcyjnym prawie w tym samym stosunku (1 : 0.65), możemy już na podstawie tych oznaczeń przypuszczać, że różnice w eliminowaniu tych dwu soli magnezowych są znacznie mniejsze, niż soli, iniekowanych w doświadczeniu poprzednim.

Tabela IX.

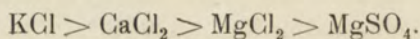
Obliczone na podstawie danych tabeli VIII ilości magnezu i siarki, pozostające w różnych odstępach czasu w krwiobiegu po iniekcji roztworu MgCl_2 i MgSO_4 .

Quantités de magnésium et de soufre inorganique, qui restent dans le système circulatoire de Crabe dans les divers délais de temps, après l'injection de la solution de MgCl_2 et de MgSO_4 . Ces quantités ont été calculées d'après les données du tableau VIII.

Czas od chwili wstrzyknięcia <i>Temps écoulé après l'injection</i> h	Mg całkowita <i>total</i> mg/ cm^3	S całkowita <i>total</i> mg/ cm^3	Mg		Stosunek: <i>Rapport:</i> Mg [MgCl_2] Mg [MgSO_4]
			jako MgSO_4 <i>comme</i> mg/ cm^3	jako MgCl_2 <i>comme</i> mg/ cm^3	
1.7	1.942	1.225	0.928	1.014	1.09
3.2	1.566	0.994	0.753	0.813	1.08
10.7	1.120	0.712	0.540	0.580	1.01
23.5	0.756	0.528	0.400	0.356	0.89
144.0	0.172	0.121	0.092	0.080	0.87

W celu ustalenia kierunku i wielkości tej różnicy, podajemy w tab. IX obliczone ilości jonów magnezowych, związanych z Cl' i SO_4'' , które w kolejnych momentach doświadczenia (tab. X) jeszcze pozostawały w hemolimfie. Z wartości stosunku ilościowego tych jonów (ostatnia kolumna tab. IX), stale zmniejszającego się w miarę trwania doświadczenia, wnioskujemy, że MgCl_2 jest wydalany z hemolimfy z większą szybkością, niż MgSO_4 .

Na podstawie więc obu doświadczeń możemy ustalić następujący szereg, wyrażający względną szybkość, z jaką badane przez nas sole mineralne są eliminowane z krwiobiegu kraba:



3. Rola gruczołu czułkowego.

Wychodząc z założenia, że o roli gruczołu czułkowego w wydaleniu elektrolitów może dać pierwsze orientacyjne pojęcie porównanie składu mineralnego moczu i hemolimfy u zwierząt normalnych (głodzonych), wykonaliśmy kilka seryj oznaczeń niektórych jonów w obu cieczach. W tabeli podajemy wyniki dwu seryj takich oznaczeń, w których stężenie jonów w moczu możemy porównać ze składem mineralnym cieczy międzycząstkowej hemolimfy.

Tabela X.

Porównanie składu mineralnego hemolimfy, wody morskiej i moczu.

Mise en parallèle de la composition minérale de l'hémolymph avec celle de l'eau de mer et de l'urine.

Składniki <i>Composants</i>	Doświadczenie № XIII. Zwierzę № 7a. <i>№ de l'expérience: XIII. № 7a de l'animal</i>			Doświadcz. № XV. Zwierzę № 9 <i>№ de l'exp.: XV, № 9 de l'animal</i>	
	Woda morska <i>Eau de mer</i>	Ultraprzesącz z hemolimfy <i>Liquide ultra- filtré de l'hé- molymphe</i>	Mocz <i>Urine</i>	Ultraprzesącz z hemolimfy <i>Liquide ultra- filtré de l'hé- molymphe</i>	Mocz <i>Urine</i>
	mg/cm ³	mg/cm ³	mg/cm ³	mg/cm ³	mg/cm ³
Cl	22.62	22.20	22.20	22.44	21.60
S	1.071	0.840	1.220	—	—
K	0.534	0.643	0.528	0.677	0.562
Ca	0.517	0.460	0.561	0.436	0.626
Mg	1.702	1.242	1.725	1.283	1.933

Przeglądając liczby tej tabeli, widzimy, że skład mineralny moczu kraba głodzonego jest naogół dosyć zbliżony do składu hemolimfy. Gdy jednak pewne jony znajdują się w obu cieczach w stężeniach prawie identycznych (Cl), to stężenia innych ujawniają bardzo charakterystyczne różnice. Dotyczy to przede wszystkim niedającego się na razie wyjaśnić faktu, że potas znajduje się w moczu w stężeniu znacznie mniejszym (o 17.9 i 17.0%), niż w hemolimfie. Inne natomiast składniki, a więc wapń, magnez i siarka nieorganiczna, są stale bardziej stężone w moczu, niż w cieczy międzycząstkowej hemolimfy, i to — w znacznym stopniu, gdyż w obu przypadkach w moczu znajdujemy wapnia o 22 i 44%, magnezu o 39 i 51% i siarki prawie o tyleż, bo — o 45% więcej, niż w hemolimfie.

Interpretacja wyników doświadczeń, w których krabom wstrzykiwano sole, jest o wiele trudniejsza. Przedewszystkiem z tego powodu, że nie byliśmy w możności ilościowego oddzielenia moczu, przypadającego na dany okres doświadczalny, a następnie — ze względu na zmiany, jakie wprowadza odbiałczenie w rozmieszczeniu elektrolitów między fazą rozdrobioną i wodną hemolimfy. Pierwsza okoliczność może sprawić, że znalezione stężenie w moczu będzie większe od tego, w jakim jon badany został wydalony z hemolimfy, druga zaś — może być przyczyną, iż oznaczone stężenie danego składnika mineralnego w hemolimfie jest mniejsze od rzeczywistego, t. j. od stężenia, w jakim on występuje w cieczy międzycząstkowej hemolimfy, przepływającej przez gruczoł czułkowy. Biorąc pod uwagę powyższe zastrzeżenia, możemy jednak na podstawie wyników, podanych w tabelach VII i VIII, dojść do następujących wniosków ogólnych.

W większości doświadczeń krzywe, wyrażające stężenia w moczu i w hemolimfie jonów, wprowadzonych do krwiobiegu, biegną prawie równoległe do siebie. Podobnie, jak u zwierząt normalnych, i tutaj również potas stanowi wyjątek, gdyż po iniekcji stosunkowo znacznych ilości KCl (tab. VII) stężenie jonów potasowych w moczu w pierwszych godzinach doświadczenia wcale się nie zwiększa, a nawet przeciwnie — ulega wyraźnemu zmniejszeniu, pomimo że w hemolimfie stwierdzono znaczny przyrost stężenia potasu.

Co się tyczy sprawy stosunku ilościowego stężeń, to pomijając potas, którego ilość w moczu jest w przebiegu doświadczenia przeważnie mniejsza, niż w hemolimfie, wszystkie inne składniki — wapń, magnez i siarka nieorganiczna są, podobnie jak i u zwierząt normalnych, wydalone w moczu w większym stężeniu. Szczególnie wyraźne rezultaty osiągnięto w doświadczeniach, w których wstrzykiwano CaCl_2 (tab. VII) i MgSO_4 (tab. VIII): w pierwszym przypadku nadwyżka wapnia w moczu dochodziła do 9% (nie biorąc pod uwagę faktu, iż w surowicy odbiałczonej stężenie jego jest o ca. 12% większe, niż w ultraprzęsącu), w drugim zaś — intensywnie (w 13%) wiążący się w hemolimfie magnez i siarka mineralna występowały w moczu w stężeniach znacznie większych, dochodzących do 13% (tab. VIII, obserw. № 5) wzgl. do 20% (obserw. № 3), niż w hemolimfie odbiałczonej.

Na podstawie więc faktów powyższych i uwzględniając zastrzeżenia, wyrażone na początku tego rozdziału, możemy uważać za uzasadniony pogląd na gruczoł czułkowy, jako na narząd wydalniczy, stężający znajdujące się w hemolimfie sole wapniowe i magnezowe.

W celu stwierdzenia, jaka rola w procesie usuwania elektrolitów z krwiobiegu przypada w udziale nerce, niezbędna jest prócz składu mineralnego moczu znajomość szybkości jego prze-

Tabela XI.

Szybkość wydalania moczu przez *Maja squinado*. Ciężar ciała zwierzęcia = 2190 g. Przed rozpoczęciem obserwacji wyciągnięto 31 cm³ moczu.

Vitesse de l'excrétion de l'urine chez Maja squinado. Poids du corps de l'animal = 2190 gr. Avant le commencement de l'observation on a recueilli ca. 31 cm³ d'urine.

Okresy zbierania moczu <i>Périodes dans lesquels l'urine a été recueillie</i>	Czas trwania każdego okresu <i>Durée de chaque période</i>	Wydalona ilość moczu <i>Quantités de l'urine excrétées</i>			
		w czasie każdego okresu <i>pendant chaque période</i>	w obliczeniu na jedną godzinę <i>pendant une heure</i>	przeciętnie na jedną godzinę <i>moyenne par heure</i>	przeciętnie na jedną dobę <i>moyenne par 24 h.</i>
		h	cm ³	cm ³	cm ³
16. II. 11 ³⁰ — 16. II. 19 ⁰⁰	7.5	18	2.41	} 1.96	} 47.0
" " 19 ⁰⁰ — " " 22 ⁵⁵	3.9	12	3.07		
" " 22 ⁵⁵ — 17. II. 12 ⁰⁰	13.1	18	1.37		
17. II. 12 ⁰⁰ — 17. II. 16 ⁰⁰	4.0	19	4.75	} 2.54	} 61.0
" " 16 ⁰⁰ — " " 22 ³⁰	6.5	17	2.61		
" " 22 ³⁰ — 18. II. 11 ⁰⁰	12.7	23	1.81		
18. II. 11 ⁰⁰ — 18. II. 13 ³⁵	2.5	12	4.80	} 2.65	} 63.6
" " 13 ³⁵ — " " 21 ³⁰	7.9	24	3.04		
" " 21 ³⁰ — 19. II. 12 ⁰⁰	14.5	30	2.07		

plywu przez gruczoł wydalniczy kraba. Pomiaru tego rodzaju natrafiają jednak — jak już wspomnieliśmy — na znaczne trudności z powodu niemożności ilościowego oddzielenia moczu. Dlatego też liczby nasze mogą mieć znaczenie tylko wartości przybliżonych.

Wyniki jednej z takich obserwacji, trwającej trzy doby, wykonanej na wyjątkowo dużym zwierzęciu (2190 g), zostały umieszczone w tab. XI. Zwierzę stałe znajdowało się w akwarjum, z którego wyjmowano go tylko na czas zbierania moczu. Zabieg ten, po możliwie dokładnem opróżnieniu pęche-

rzów moczowych na początku, powtarzano co pewien czas (co 4 — 14 g.), wyciągając ciecz z obu otworów moczowych i notując za każdym razem jej objętość. Jak widzimy, obliczona szybkość produkcji moczu na godzinę waha się w dużych granicach (1.37 — 4.80 cm³), i jest naogół mniejsza w godzinach nocnych, gdy zwierzę pozostawało bez kontroli. W obliczeniu na dobę liczby te mniej odbiegają od siebie (47.0 — 63.6 cm³), średnia zaś szybkość z trzech dni wynosi 57.3 cm³. Stanowi to w obliczeniu na kilogram masy zwierzęcia i na dobę zaledwie 26.1 cm³, czyli innymi słowy, ilość przepływającej na dobę wody przez nerki kraba w warunkach normalnych jest zapewne nie o wiele większa od wartości, wynoszącej 3% masy ciała kraba.

Wobec tego faktu i wobec okoliczności, że w warunkach doświadczalnych stężenie poszczególnych soli w moczu tylko nieznacznie różni się od stężenia tych składników w hemolimfie, dochodzimy do wniosku, że udział gruczołu czułkowego w usuwaniu nadmiaru elektrolitów z krwiobiegu jest bardzo nieznaczny.

Dla zorientowania się w wartości liczbowej tego udziału, na podstawie jednego z doświadczeń przeprowadziliśmy obliczenie ilości absolutnych składnika injekowanego, które w przeciągu danego czasu znikają z krwiobiegu i zjawiają się w moczu. Za podstawę obliczeń wzięliśmy doświadczenie (tab. VIII), w którym wstrzyknięto duży nadmiar jonów magnezowych, znikających — jak wiadomo — dosyć powoli z krwiobiegu i wydalanych w moczu w stężeniu większym od tego, w jakim znajdują się one w hemolimfie.

Biorąc pod uwagę np. okres czasu między drugą a piątą obserwacją (tab. VIII) oraz średnią szybkość wydalania moczu przez kraba (31.8 cm³ na 24 godz.) i prócz tego — przeciętne stężenie magnezu w moczu (2.923 mg/cm³) i w wodzie morskiej (1.702 mg/cm³), resorbowanej na miejsce wydalanego moczu, otrzymamy ilość magnezu, która zostaje usuwana drogą nerkową, równą 35 mg. Ilość magnezu, która w tym samym czasie, t. j. w ciągu 21.8 godz., znika z krwiobiegu, obliczamy z różnicy między jego ilością w hemolimfie na początku (3.366 mg/cm³) i w końcu (2.180 mg/cm³), znając objętość hemolimfy w zwierzęciu. Przyjmując, że ilość hemolimfy w ciele kraba wynosi

około 40% wagi żywej¹⁾, t. j. za równą około 500 cm³, dochodzimy do wartości, wynoszącej około 590 mg magnezu, eliminowanych z krwiobiegu, wobec 35 mg, które zostały usunięte drogą nerkową.

W omawianem więc doświadczeniu zwierzęta wydalily wraz z moczem zaledwie 6% tej ilości magnezu, która zniknęła z hemolimfy. W jeszcze mniejszym stopniu gruczoł czulkowy współdziała w usuwaniu innych katjonów.

Fakty te wskazują na to, iż w przypadku gwałtownego zakłócenia normalnego składu elektrolitów w hemolimfie, wchodzi w grę znacznie potężniejsze i sprawniej od gruczołów czulkowych działające mechanizmy, szybko usuwające nadmiar wprowadzonych jonów.

Dyskusja.

Doświadczenia nasze, w których wprowadzaliśmy do krwiobiegu sole i badaliśmy ich zachowanie się, dowodzą, że kraby posiadają zdolność usuwania z hemolimfy nadmiaru elektrolitów, naruszających normalne stosunki międzyjonowe. Proces eliminowania składników zbędnych i powrót do stosunków normalnych trwa różnie długo, zależnie od ilości i jakości soli, wprowadzonych do cieczy ciała zwierzęcia.

Że zwierzęta pojkilosmotyczne, żyjące w wodzie morskiej, są organizmami *homiochemicznymi*, wydaje się a priori koniecznością fizjologiczną. Niewyjaśniony bowiem pozostałby fakt, że większość bezkręgowców w tym kierunku zbadanych, ujawniając identyczne z wodą morską stężenie osmolarne elektrolitów i poddając się biernie zmianom ciśnienia osmotycznego w środowisku zewnętrznym, posiada pomimo to skład mineralny osocza, wykazujący — w porównaniu z wodą morską — znaczne różnice stężeń poszczególnych składników mineralnych (MACAL-

¹⁾ U kraba № 6 (602 g), którego użyliśmy do tego oznaczenia, znaleźliśmy drogę bezpośrednią, t. j. drogą upustu, 40,6% hemolimfy w stosunku do ciężaru ciała. Zwierzę to było poprzednio użyte do doświadczenia, w którym wstrzykiwano do krwiobiegu MgSO₄; obliczenie objętości hemolimfy, przeprowadzone na podstawie znajomości stężenia siarki nieorganicznej przed iniekcją (0,875 mg/cm³) i wkrótce po niej (2,736 mg/cm³), doprowadziło do liczby 44,7%, zbliżonej do znalezionej bezpośrednio.

LUM 10). W przypadku np. *Maja squinado* (tab. X) stężenie wapnia, magnezu i siarki nieorganicznej w hemolimfie zwierzęcia głodzonego są odpowiednio o 11%, 27% i 22% mniejsze, niż w wodzie morskiej.

Również niezrozumiałym byłby fakt stałości składu mineralnego cieczy ciała tych zwierząt, czy to w stanie głodu, w czasie którego z tkanek, ulegających zużyciu, przechodzą do krwiobiegu elektrolity w odmiennym niż w osoczu stosunku, czy też w warunkach odżywiania, gdy powierzchnia chłonna jelit wprowadza do hemolimfy wraz z pokarmem zmienne ilości soli, w innej niż w hemolimfie proporcji.

Zagadnieniem, które wymaga specjalnego wyjaśnienia jest kwestja mechanizmu tego zjawiska, niedostatecznie jasna w świetle bezpośrednich wyników naszych poszukiwań. Wykazały one bowiem, że gruczoł czułkowy jest narządem wydalniczym, pracującym niezmiernie powoli: mogąc w zwykłych warunkach życia krabów, w których zapewne zachodzą niewielkie zmiany w stosunkach jonowych hemolimfy, sprostać zadaniu, nerka krabów nie jest w możności eliminowanie całego nadmiaru składników, doświadczalnie wprowadzonych do krwiobiegu.

Zachodzi więc pytanie, jakimi drogami ten nadmiar jest usuwany z cieczy ciała zwierzęcia?

Nie jest rzeczą wykluczoną, że część tego nadmiaru jest wydalana przez części miękkie pokrycia ciała: decydującymi w tym kierunku byłyby doświadczenia, w których po iniekcji i po zamknięciu otworów gębowego i odbytowego oraz otworów moczowych umieszczano zwierzę w wodzie morskiej, oznaczając w niej stężenie injekowanych elektrolitów. W tym sensie należy interpretować badania BETHE'GO (128) nad *Carcinus Maenas*, w których występowała zniżka normalnego stężenia niektórych elektrolitów we krwi kraba, umieszczonego w sztucznej, pozbawionej tych elektrolitów wodzie morskiej. Doświadczenia te jednak nie są całkowicie przekonujące z tego powodu, że możliwość resorbowania przez przewód pokarmowy wody morskiej nie była eksperymentalnie wyłączone.

W naszych doświadczeniach czynnik dyfuzji przez powierzchnie ciała odgrywał prawdopodobnie rolę podrzędną. Wskazuje na to szybkość, z jaką niektóre sole injekowane znikają z krwiobiegu. Np. w doświadczeniu, w którym wstrzykiwano mieszaninę

$KCl + CaCl_2 + MgCl_2$ (tab. VII i rys. 2), całkowita ilość wprowadzonego potasu (196 mg) zniknęła z hemolimfy już po upływie 2 godz. 16 min., zaś z ogólnej ilości injekowanego wapnia (165 mg) po upływie 4 godz. 20 min. nie znaleziono już ani śladu w osoczu.

Okoliczność ta przemawia za istnieniem w organizmie urządzeń, szybciej działających, niż nerki lub powierzchnie ciała. Przeprowadzając analogję ze zjawiskami regulacji składu mineralnego osocza u zwierząt homoosmotycznych (MAGNUS '00), widzimy wiele przesłanek, przemawiających za tem, że i w danym przypadku mamy do czynienia ze stanem równowagi odwracalnej między osoczem, z jednej strony, a tkankami ciała, z drugiej. Naruszenie równowagi w sensie zmiany koncentracji jednego ze składników mineralnych w hemolimfie powoduje wiązanie lub uwalnianie tego składnika przez tkanki. W naszych doświadczeniach wchodziłoby w grę szczególnie silne powinowactwo w stosunku do tkanek soli potasowych, najszybciej znikających z hemolimfy i wywołujących silne działanie trujące.

Nerki i inne układy wydalnicze pełnią rolę wentylów o wąskim wylocie, wrażliwych na małe zmiany stężeń parcjalnych, które ustawicznie zachodzą w wewnętrznym środowisku ustroju.

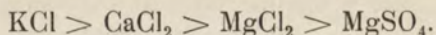
Streszczenie wyników.

1°. *Maja squinado*, posiadająca skład i stężenie elektrolitów, zbliżone do wody morskiej, ujawnia wybitnie wyrażoną zdolność regulowania składu mineralnego cieczy ciała: wprowadzone do krwiobiegu sole, będące normalnymi składnikami hemolimfy, po krótszym lub dłuższym przeciągu czasu całkowicie znikają z osocza.

2°. Zdolność usuwania z cieczy ciała nadmiaru składników mineralnych nie jest jednakowa w stosunku do poszczególnych soli: najszybciej jest eliminowany silnie trujący chlorek potasu, najpowolniej — siarczan sodu.

3°. Doświadczenia, w których wstrzykiwano zwierzęciu mieszaninę dwu lub więcej soli, w ilościach, w jednakowym stopniu zwiększających ich stężenie w hemolimfie, wykazały, że z punktu

widzenia szybkości znikania z krwiobiegu przedstawiają one następujący szereg:



4°. Gruczoł czulkowy posiada zdolność usuwania z osocza nadmiaru elektrolitów: dowodzą tego doświadczenia, w których analizowano zbierane jednocześnie próbki moczu i hemolimfy.

5°. Jony wapniowe, magnezowe i siarczanowe występują w moczu zwierząt normalnych i doświadczalnych w stężeniach większych, niż w hemolimfie.

6°. Ze względu na małą szybkość przepływu wody przez gruczoł czulkowy (wynoszącą około 3% masy ciała na dobę) oraz ze względu na zdolność nieznacznego tylko zagęszczenia niektórych elektrolitów w moczu, narząd ten posiada cechy układu wydalniczego, pracującego bardzo powoli. W zjawiskach usuwania z hemolimfy dużych ilości elektrolitów, zwłaszcza w pierwszych momentach po iniekcji, narządowi temu przypada bardzo niewielki udział.

7°. Istnieją dane, przemawiające za tem, że główną rolę w tych zjawiskach pełnią tkanki ciała (mięśnie?) zwierzęcia, które wychwytyją i wiążą nadmiar wprowadzonych do krwiobiegu związków mineralnych.

Piśmiennictwo.

- Bell R. D. and E. A. Doisy. 1920. Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood. *Journ. of biol. Chem.* **44** (55).
 Bethe A. 1908. Die Bedeutung der Elektrolyten für die rhythmischen Bewegungen der Medusen. I Theil. Die Wirkung der im Seewasser enthaltenen Salze auf die normale Meduse. *Arch. f. d. ges. Physiol.* **124** (541).
 Bethe A. 1927. Der Einfluss der Ionen der Seewassers auf rhythmische Bewegungen der Meerestieren. *Arch. f. d. ges. Physiol.* **217** (456).
 Bethe A. 1928. Jonendurchlässigkeit der Körperoberfläche von wirbellosen Tieren des Meeres als Ursache der Giftigkeit von Seewasser abnormer Zusammensetzung. *Arch. f. d. ges. Physiol.* **221** (344).
 Bethe A. 1930. The permeability of the surface of marine animals. *Journ. of gen. Physiol.* **13** (437).
 Białaszewicz K. 1926. O składzie mineralnym komórek jajowych (Sur la composition minérale der oeufs). *Trav. Inst. Nencki (Varsovie)*. **3** (№ 52).
 Białaszewicz K. 1927a. Sur la composition minérale des cellules-oeufs. *Public. della Stazione Zool. di Napoli*. **8** (355).
 Białaszewicz K. 1927b. O zastosowaniu ultrafiltracji w badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w cyto-

plazmie. (Sur l'emploi de l'ultrafiltration pour l'étude de la répartition des électrolytes dans le cytoplasme). Trav. Inst. Nencki (Varsovie). 4 (№ 57). **Białaszewicz K.** 1928a. L'ultrafiltration appliquée à l'étude de la répartition des électrolytes dans le cytoplasme. Ann. de Physiol. 4 (1). **Białaszewicz K.** 1928b. Studja porównawcze nad składem cieczy międzycząstkowej komórek jajowych. Acta Biol. Exper. (Varsovie). 1 (№ 11). **Białaszewicz K.** 1929. Recherches sur la répartition des électrolytes dans le protoplasme des cellules ovulaires. „Protoplasma“. 6 (1). **Bottazzi Phil. und E. Enriques.** 1901. Über die Bedingungen des osmotischen Gleichgewichts und Gleichgewichtsmangels zwischen den organischen Flüssigkeiten und dem äusseren Medium bei den Wassertieren. Arch. (f. Anat.) und Physiol. Suppl. (109). **Briggs A. P.** 1922. A modification of the Bell-Doisy phosphate method. Journ. of biol. Chem. 53 (13). **Dekhuysen C.** 1921. Sur la semi-perméabilité biologique des parois extérieures des Sipunculides. C. R. Acad. Sc. 172 (238). **Duval M.** 1925. Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des animaux aquatiques. Modifications sous l'influence du milieu extérieur. Ann. de l'Inst. Océanogr. Nouvelle Série. 3 (233). **Fredericq L.** 1904. Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. Arch. de Biol. 20 (709). **Fredericq L.** 1922. Action du milieu marin sur les Invertébrés. Arch. intern. de Physiol. 19 (309). **Hecht G.** 1923. Bestimmung des Organkalkes nach de Waard. Bioch. Zeitschr. 143 (342). **Henri V. et S. Lalou.** 1904. Regulation osmotique des liquides internes chez les Échinodermes. Journ. de Physiol. et Path. gén. 6 (9). **Kramer B. and F. F. Tisdall.** 1921. A clinical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. Journ. of biol. Chem. 46 (339). **Macallum A. B.** 1903. On the inorganic composition of the medusae *Aurelia flavidula* and *Cyanea arctica*. Journ. of Physiol. 29 (213). **Macallum A. B.** 1910. The inorganic composition of the blood in vertebrates and invertebrates, and its origin. Proc. Roy. Soc. B. 82 (602). **Macallum A. B.** 1926. The paleochemistry of the body fluids and tissues. Physiol. Rev. 6 (316). **Magnus R.** 1900. Über die Veränderungen der Blutzusammensetzung nach Kochsalzinfusion. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 44 (68). **Magnus R.** 1900. Über Diurese. II Mitt.: Vergleich der diuretischen Wirksamkeit isotonischer Salzlösungen. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 44 (396). **Marchal P.** 1892. Recherches anatomiques et physiologiques sur l'appareil excréteur des Crustacés Décapodes. Arch. Zool. Expér. et Gén. Sér. II. 10 (57). **Quinton R.** 1900. Perméabilité de la paroi extérieure de l'invertébré marin, non seulement à l'eau, mais encore aux sels. C. R. Acad. Sc. 131 (952). **Quinton R.** 1912. L'eau de mer, milieu organique. 2-me édition. Paris (Masson). **de Waard D. J.** 1919. Eine Mikrobestimmung des Calciums in Blut, Serum und anderen organischen Substanzen. Bioch. Zeitschr. 97 (176). **Whitehorn J. C.** 1921. A system of blood analysis. Simplified method for the determination of chlorides in blood plasma. Journ. of biol. Chem. 45 (449).

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

O zagadnieniu dwóch prób. — On the Problem of Two Samples.

Mémoire

de MM. E. S. PEARSON¹⁾ et J. NEYMAN²⁾,

présenté, dans la séance du 10 Février 1930, par M. Cz. Białobrzęski m. t.

I. The need for distinguishing between criteria.

Professor V. Romanovsky has contributed to a recent number of *Metron* an important paper entitled „On Criteria that two given Samples belong to the same Normal Population“³⁾. The paper is divided into two parts; the first concerns the cases where the samples are compared with respect to one variable character only, while in the second it is supposed that measures on a number of characters have been made. We propose to consider here certain aspects of the first problem which is the more fundamental, although the development of analogous tests in the second problem is of considerable interest and appears to be novel.

The process of testing the hypothesis, H , that two observed samples, Σ_1 and Σ_2 , have come from the same unknown normal population π consists (for Prof. Romanovsky) (1) in supposing H to be true, and (2) deducing the frequency distribution (determined by this hypothesis) in repeated random sampling, of certain functions of the sample means and standard deviations, which Professor Romanovsky calls the „belonging coefficients“ or fully „coefficients of samples belonging to the same general population“. The problem of deducing the frequency distribution

¹⁾ Galton Laboratory, University College, London.

²⁾ Biometric Laboratory, Nencki Institute, Warsaw.

³⁾ *Metron*, Vol. VII, No. 3, p. 346.

of such coefficients is often a very difficult one and Professor Romanovsky has succeeded in reaching several new results, either expressing them in the form of series or by giving the moment coefficients of their distributions. This is an important achievement, but there lies at the very basis of the question another problem, which he does not appear to have fully considered, that of distinguishing between these coefficients or criteria and determining which is the most appropriate one to use in any given case. We have discussed elsewhere certain principles regarding the testing of hypotheses, which we believe to be intuitively sound¹). They are not, strictly speaking, mathematical results and may be rejected by those who do not believe in them. But we think that any reader who will follow us in examining Romanovsky's results will be convinced that some logical principle must be adopted in choosing between the various criteria.

Suppose that the two samples Σ_1 and Σ_2 have respectively

n_1 individuals with mean character \bar{x}_1 and standard deviation s_1 ,
 n_2 " " " " " \bar{x}_2 " " " " " s_2 .

Romanovsky considers four alternative criteria for testing the hypothesis H , namely that Σ_1 and Σ_2 are random samples from the same normal population π . These are

$$(1) \quad \alpha = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}; \quad (2) \quad u = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}};$$

$$(3) \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}; \quad (4) \quad \theta = \frac{s_2^2}{s_1^2}.$$

With regard to these criteria he gives the following results:

a) the frequency distribution of α , in the form of a series, which however appears to be too complicated as it stands for practical purposes.

¹) *Biometrika* XX-A, pp. 175—240 and 264—294. „On the Use and Interpretation of certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference“. See also: J. Neyman: „Contribution to the Theory of Certain Test Criteria“. *Bull. International Statist. Institute*, 1929.

b) The Normal Law as the limiting form of the frequency distribution of u . The proof is carried out by finding general expressions for the moment coefficients of u , and making use of the Tchebycheff-Markoff theorem regarding their limiting values¹⁾. In the case of smaller samples these moment expressions might be used to fit some system of non-normal curves to the distribution.

c) A new method is given of reaching the distribution of t , that originally given by R. A. Fisher²⁾.

d) The distribution of $\theta = \frac{s_2^2}{s_1^2}$ is given. This leads to the same test as used by Fisher for the comparison of two estimates of variance³⁾.

As was pointed out in our earlier paper, in testing hypotheses two considerations must be kept in view, (1) we must be able to reduce the chance of rejecting a true hypothesis to as low a value as desired; (2) the test must be so devised that it will reject the hypothesis tested when it is likely to be false. In discussing the four criteria Romanovsky is thinking primarily of this first point, and in fact all his tests provide complete control of this source of error. Suppose that ε be any small positive number, that ξ be any statistical character of both samples Σ_1 and Σ_2 , and that $\varphi(\xi)$ represents the frequency distribution of ξ deduced on the hypothesis that both samples have been drawn at random from the same normal population. Choose now two numbers ξ_1 and ξ_2 , such that

$$\int_{\xi_1}^{\xi_2} \varphi(\xi) d\xi \leq \varepsilon \tag{5}$$

and accept the principle of rejecting the hypothesis H when, and when only, the value of ξ , say ξ_0 , obtained from the observed samples is such that

$$\xi_1 \leq \xi_0 \leq \xi_2 \tag{6}$$

¹⁾ Markoff: *Wahrscheinlichkeitsrechnung*, p. 266.

²⁾ *Metron*, Vol. V, No. 3, pp. 3—9.

³⁾ *Statistical Methods for Research Workers*, p. 194. Fisher uses the transformation $z = \frac{1}{2} \log \left\{ \frac{n_2(n_1 - 1)s_2^2}{n_1(n_2 - 1)s_1^2} \right\}$ and has given certain tables of the z distribution.

As the chance of rejecting a true hypothesis H is the product of (1) the chance of dealing with a true hypothesis, and (2) the chance of obtaining a ξ_0 satisfying (6), calculated on the assumption that H be true, the chance of rejecting a true hypothesis (when we reject only in cases where (6) holds good) will be certainly less than ϵ , that is as low as desired.

From this point of view, provided that (5) is satisfied, any values of ξ_1 and ξ_2 might be chosen, and further any statistical character ξ would be equally suitable. But it is clear when we examine the statistical tests in common use that a consciousness, if somewhat vaguely defined, of what we have termed the second source of error, has determined the particular characters ξ chosen as criteria and also the position of the limiting values ξ_1 and ξ_2 in the $\varphi(\xi)$ distribution. For example, the first three characters α , u and t considered by Romanovsky depend upon the difference $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$. The reasoning which underlies this choice is presumably as follows. If the hypothesis H were false, then probably the means of the two sampled populations would differ, and this is likely to cause a large value of the difference $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$; therefore if this difference be large it is dangerous to accept the hypothesis. For this reason the numbers ξ_1 and ξ_2 are chosen in a manner slightly different to that indicated above, namely the hypothesis H is rejected when

$$(7) \quad \xi_0 \leq \xi_1 \quad \text{or} \quad \xi_2 \leq \xi_0$$

and the sum of the two integrals

$$\int_{-\infty}^{\xi_1} + \int_{\xi_2}^{+\infty} \varphi(\xi) d\xi \leq \epsilon.$$

But clearly the tests with α , u and t are not really sensitive to differences in population standard deviations. We may for instance have two pairs of samples in one of which s_1 and s_2 are almost equal, while in the second pair one is many times as great as the other; and yet both may provide the same value of t . That is to say, in certain cases the test would not distinguish what is otherwise obvious, that the standard deviations of the sampled populations may in one case be the same, but in the other can hardly

be so. On the other hand the 4th criterion, Θ , will distinguish differences between the population standard deviations, but is quite insensitive to differences between their means.

It would not be difficult to give examples of pairs of samples which would lead to contradictory conclusions about the hypothesis H when different tests are applied, and in such cases which conclusion is to be drawn? That unfavourable to the hypothesis? Not necessarily so, for given any two samples it is always possible to choose a statistical character ξ , or simply the numbers ξ_1 and ξ_2 so that the verdict based on such a ξ test would be unfavourable to H ¹⁾.

It is for this reason that we have felt the need of finding a logical basis for the choice of one test rather than another. Owing to the fact that the control of the error involved in rejecting a true hypothesis can be obtained when any statistical character of the two samples is used, we may choose this character in such a way that it will minimise the danger of accepting the hypothesis when it is false. Of course this word „danger“ must be clearly defined.

¹⁾ Neyman (La Revue trimestrielle de Statistique de la République Polonaise, t. VI, fasc. 4) has illustrated this point in testing the composite hypothesis that a single sample of n with mean \bar{x} and standard deviation s has come from some normally distributed population with mean a . Here we should ordinarily use „Student's“ t (or z) test, namely calculate $z = t\sqrt{n-1} = \frac{|x-a|}{s}$, refer to the appropriate tables and so find P_z , or the chance of obtaining in random sampling a value of z so large or larger than that observed. In n -dimensioned space z is the cotangent of the angle ψ between the vector representing the sample and the diagonal

$$x_1 = x_2 = \dots = x_n;$$

P_z is the integral of the normal spherical density field lying outside the hypercone with semi-vertical angle ψ .

If now we were to take as criterion not z , but ξ , the cotangent of the angle between the sample vector and the axis

$$\frac{x_1}{\alpha_1} = \frac{x_2}{\alpha_2} = \dots = \frac{x_n}{\alpha_n}$$

the distribution of ξ in sampling would still follow Student's law. But for a given sample the value of P_ξ could be made to assume any value whatsoever lying between 0 and 1, by an appropriate choice of the direction cosines $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$, of the axis of the hypercone. A similar „nonsense“ criterion could be found for the case of two samples.

We have assumed that the danger of the hypothesis being false can be measured by the „likelihood“ of that hypothesis¹⁾. The justification of this principle rests upon the consideration of simple problems of testing hypotheses where an intuitive verdict may easily be reached. It appears that we are always inclined to reject a hypothesis H in cases where there are possible alternative hypotheses which make the probability of occurrence of the observed events (such as of drawing the samples Σ_1 and Σ_2) much greater than that determined by H . It was this idea that led to that definition of the likelihood of a hypothesis.

II. Application of the Method of Likelihood to the Problem.

Let us try to consider the problem of Professor Romanovsky from this point of view, first making the conditions a little more precise. To commence with it is necessary to fix the set, Ω , of admissible hypotheses concerning the populations from which Σ_1 and Σ_2 have been drawn²⁾. The most general assumption would be that these populations may be of any form whatsoever, normal or not normal. The less general assumption which we shall adopt is that Σ_1 and Σ_2 have come from some normal population π_1 and π_2 having any values a_1 and a_2 , σ_1 and σ_2 for their means and standard deviations. Then we wish to test the hypothesis H (which we have termed a composite hypothesis) that the populations π_1 and π_2 belong to the subset ω of Ω for which

$$(9) \quad a_1 = a_2, \quad \sigma_1 = \sigma_2$$

that is to say, that π_1 and π_2 are identical.

The chance of drawing from populations π_1 and π_2 two samples Σ_1 and Σ_2 with values of the variables

$$x_1, x_2, \dots, x_n, x_{n+1}, x_{n+2}, \dots, x_{n+n_2}$$

lying within the limits

$$x_1 - \frac{1}{2}h, \quad x_1 + \frac{1}{2}h; \quad x_2 - \frac{1}{2}h, \quad x_2 + \frac{1}{2}h; \quad \text{etc.}$$

¹⁾ The term „likelihood“ was introduced by R. A. Fisher (*Phil. Trans. Roy. Soc.* Vol. 222 A, p. 326); we have somewhat extended the definition (*Biometrika* XX A, pp. 234—265).

²⁾ The terminology is that explained in *Biometrika* XX A, pp. 264—265.

will, as h tends to zero, be asymptotic to

$$C = \left(\frac{1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \right)^{n_1} \left(\frac{1}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \right)^{n_2} e^{-n_1 \frac{(\bar{x}_1 - a_1)^2 + s_1^2}{2\sigma_1^2} - n_2 \frac{(\bar{x}_2 - a_2)^2 + s_2^2}{2\sigma_2^2}} h^{n_1 + n_2} \quad (10).$$

It is easy to show that the maximum value of C associated with a pair of populations belonging to the set Ω is obtained when

$$a_1 = \bar{x}_1, \quad a_2 = \bar{x}_2, \quad \sigma_1 = s_1, \quad \sigma_2 = s_2,$$

and hence

$$C(\Omega \text{ max.}) = \left(\frac{1}{s_1 \sqrt{2\pi}} \right)^{n_1} \left(\frac{1}{s_2 \sqrt{2\pi}} \right)^{n_2} e^{-\frac{n_1 + n_2}{2}} h^{n_1 + n_2} \quad (11).$$

We must now find the maximum value of C associated with a population belonging to ω . This we may do by first noting that if $a_1 = a_2 = a$ (say) and $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$ (say), we can write (10) as

$$C = \left(\frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \right)^{n_1 + n_2} e^{-(n_1 + n_2) \frac{(\bar{x}_0 - a)^2 + s_0^2}{2\sigma^2}} h^{n_1 + n_2} \quad (12)$$

where \bar{x}_0 and s_0 are the mean and standard deviation obtained by combining the $n_1 + n_2$ variables of the samples Σ_1 and Σ_2 . It now follows that the maximum chance occurs when

$$a = \bar{x}_0, \quad \sigma = s_0$$

and

$$C(\omega \text{ max.}) = \left(\frac{1}{s_0 \sqrt{2\pi}} \right)^{n_1 + n_2} e^{-\frac{n_1 + n_2}{2}} h^{n_1 + n_2} \quad (13).$$

The expression for the likelihood of the composite hypothesis H that Σ_1 and Σ_2 have been randomly drawn from the same normal population is therefore

$$\lambda_H = \frac{C(\omega \text{ max.})}{C(\Omega \text{ max.})} = \left(\frac{s_1}{s_0} \right)^{n_1} \left(\frac{s_2}{s_0} \right)^{n_2} \quad (14).$$

If this ratio be small, it means that whatsoever be the hypothetical population π from which we may suppose Σ_1 and Σ_2 have

been drawn, the probability of obtaining these samples from π is much smaller than the probability of getting them from some two different normal populations. On the other hand, if the λ_H of (14) is a number approaching unity, then there are certainly some normal populations π such that the probability of drawing Σ_1 and Σ_2 from π is not so very much less than that of drawing them from two different populations. Speaking roughly, in the first event there are no normal populations from which both samples could easily have come, while in the second such populations do exist. λ_H is therefore the criterion suggested for testing the hypothesis H .

It will be noted that

$$(15) \quad s_0^2 = \frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2} + \frac{n_1 n_2}{(n_1 + n_2)^2} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2$$

and therefore if we write

$$(16) \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

and

$$(17) \quad \theta = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

we obtain

$$(18) \quad \lambda = (n_1 + n_2)^{\frac{n_1 + n_2}{2}} \theta^{\frac{n_2}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-\frac{n_1 + n_2}{2}} \left(1 + \frac{t^2}{n_1 + n_2 - 2} \right)^{-\frac{n_1 + n_2}{2}}$$

that is to say λ_H can be expressed as a function of two of the four coefficients given by Romanovsky. This is a point of considerable interest because the tests associated with t and θ (which are the „Student“ and R. A. Fisher tests) are in fact those suggested by measuring the likelihood not of the full hypothesis H , but of certain modified hypotheses H_1 and H_2 . We shall first proceed to consider this point.

In all three cases we assume that Σ_1 and Σ_2 have come from some two normal populations, but

1) The hypothesis H_1 is that the samples have come from unknown normal populations with the same variance, but with

means having any values a_1 and a_2 whatsoever. Here θ is the appropriate criterion.

2) While if it be assumed that the populations besides being normal have the same variance, then the hypothesis H_2 is that the means in these populations are the same. Here t is the appropriate criterion.

The deduction of the t -test from the principle of likelihood has already been discussed by us¹). It was shown that, if t is as defined in (16), then the likelihood of the hypothesis H_2 is

$$\lambda_{H_2} = \left(1 + \frac{t^2}{n_1 + n_2 - 2}\right)^{-\frac{n_1 + n_2}{2}} \quad (19)$$

and as „Student“ has shown, the frequency distribution of t in repeated samples Σ_1 and Σ_2 from a common normal population is

$$f(t) = \frac{\Gamma\left(\frac{n_1 + n_2 - 1}{2}\right)}{\sqrt{\pi(n_1 + n_2 - 2)} \Gamma\left(\frac{n_1 + n_2 - 2}{2}\right)} \left(1 + \frac{t^2}{n_1 + n_2 - 2}\right)^{-\frac{n_1 + n_2 - 1}{2}} \quad (20).$$

λ_{H_2} has its maximum value of unity when $t = 0$ or $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$, and decreases as $t \rightarrow \pm \infty$. The chance of obtaining in sampling a value of λ_{H_2} less than that observed may therefore be obtained from the probability integral of (20).

Let us examine the likelihood of hypothesis H_1 . Ω is the set of all possible pairs of normal populations with means a_1 and a_2 , and standard deviations σ_1 and σ_2 , and $C(\Omega \max)$ has the value given in (11). But ω is the subset of populations in which $\sigma_1 = \sigma_2$ while a_1 and a_2 have any values. We must therefore choose a_1 , a_2 and a common value of $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$ (say) as to maximise

$$C = \left(\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\right)^{n_1 + n_2} e^{-\frac{n_1[(\bar{x}_1 - a_1)^2 + s_1^2] + n_2[(\bar{x}_2 - a_2)^2 + s_2^2]}{2\sigma^2}} h^{n_1 + n_2} \quad (21).$$

It is easily found that the values required are

$$a_1 = \bar{x}_1, \quad a_2 = \bar{x}_2, \quad \sigma^2 = \frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2},$$

¹) *Biometrika* XX A, pp. 206—207.

$$(22) \quad C(\omega \max) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \right)^{n_1+n_2} \left(\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2} \right)^{\frac{n_1+n_2}{2}} e^{-\frac{n_1+n_2}{2}} h^{n_1+n_2}$$

whence

$$(23) \quad \lambda_{H_1} = \frac{C(\omega \max)}{C(\Omega \max)} (n_1 + n_2)^{\frac{n_1+n_2}{2}} \frac{s_1^{n_1} s_2^{n_2}}{(n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2)^{\frac{n_1+n_2}{2}}} = \\ = (n_1 + n_2)^{\frac{n_1+n_2}{2}} \theta^{\frac{n_2}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2}{2}}.$$

Further, as Romanovsky has shown, the distribution of θ in repeated samples Σ_1 and Σ_2 from normal populations with a common variance is

$$(24) \quad \varphi(\theta) = \frac{n^{\frac{n_1-1}{2}} n^{\frac{n_2-1}{2}}}{\Gamma\left(\frac{n_1-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_2-1}{2}\right)} \Gamma\left(\frac{n_1+n_2-2}{2}\right) \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1+n_2\theta)^{-\frac{n_1+n_2-2}{2}}$$

λ_{H_1} has its maximum value of unity when $\theta = 1$, or $s_1 = s_2$ and decreases as θ tends to zero or infinity, that is to say, as the difference between s_1 and s_2 increases.

It will be noticed at once from (18), (19) and (23) that

$$(25) \quad \lambda_H = \lambda_{H_1} \lambda_{H_2}.$$

We are now able to see more clearly the interpretation of λ_H . The likelihood can only attain its maximum value of unity when both $\theta = 1$ and $t = 0$, or $s_1 = s_2$ and $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$. It will decrease towards zero when

- (a) $\theta \rightarrow 0$ or s_2 becomes small compared with s_1
 or (b) $\theta \rightarrow \infty$ or s_1 becomes small compared with s_2
 or (c) $|t| \rightarrow \infty$ or $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ increases compared with

$$\sqrt{\frac{n_1 s_2^2 + n_2 s_1^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}.$$

It is clear that, on the one hand, even if $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ or $\lambda_{H_2} = 1$ we should be unable to accept H if s_1 differed considerably from s_2 (or λ_{H_1} was small). While on the other hand if $s_1 = s_2$ (or $\lambda_{H_1} = 1$)

we should feel that the populations were not the same if $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ were large compared to

$$\sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

which is an estimate based on the sample variances of the standard error of the difference in means. Thus the criterion λ_H is more crucial than either λ_{H_1} or λ_{H_2} taken separately, although of course in many problems the hypothesis to be tested will present itself in one of these common forms H_1 or H_2 ¹⁾.

From another point of view it is interesting to note the form of λ_H given in (14); we see that the hypothesis H becomes more and more improbable as either of the sample standard deviations decreases compared to the standard deviation of the pooled samples. This again is in agreement with our intuition.

These simple considerations indeed suggest that λ_H is a reasonable criterion to use in measuring the danger of accepting a false hypothesis, and it appears to satisfy our intuitive requirements in a way which neither α or u , θ , or t are able to do ²⁾. But if we accept the criterion suggested by the method of likelihood it is still necessary to determine its sampling distribution in order to control the error involved in rejecting a true hypothesis, because a knowledge of λ alone is not adequate to insure control of this error. We cannot for example say in general that if $\lambda \leq \lambda_0 = 0.01$, we should be justified in rejecting the hypothesis. In order to fix a limit between „small“ and „large“ values of λ we must know

¹⁾ For example, (a) two different angles α_1 and α_2 are measured n_1 and n_2 times respectively by the same person using the same instrument. It may then be supposed that the precision of measurements will be the same in both cases, $\sigma_1 = \sigma_2$, but we may wish to test hypothesis H_2 , namely that $\alpha_1 = \alpha_2$. (b) Some two angles α_1 and α_2 are measured several times by two observers or by the same observer with two different instruments. The question arises as to whether the precision of the two sets of measurements is the same. Does $\sigma_1 = \sigma_2$? This is the test of hypothesis H_1 . No assumption is made upon the values of α_1 and α_2 .

²⁾ Besides the paper in *Metron* already referred to Professor Romanovsky published in Russian a short Note on the same subject in which there is a sentence stating that the tests like t and θ concern the hypothesis H from two different points of view. Evidently the Author felt himself that really he was testing not the hypothesis H , but some other hypotheses.

how often such values appear when we deal with a true hypothesis. That is to say we must have a knowledge of P_{λ_0} , the chance of obtaining $\lambda \leq \lambda_0$ in the case where the hypothesis tested is true. The frequency distribution of λ differs according to the size of samples and the nature of the hypothesis tested, and it may well happen that the modal value of λ is in the neighbourhood of zero. For the cases of H_1 and H_2 the distributions (24) and (20) of θ and t provide what is required, but for H the position is not so simple.

We know that the frequency function for the simultaneous variations of \bar{x}_1 , \bar{x}_2 , s_1 and s_2 is

$$(26) \quad C_0 s_1^{n_1-2} s_2^{n_2-2} e^{-\frac{n_1(\bar{x}_1-a)^2 + n_2(\bar{x}_2-a)^2 + n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{2\sigma^2}}.$$

The value of C_0 is

$$C_0 = \frac{4 n_1^{\frac{n_1}{2}} n_2^{\frac{n_2}{2}}}{(\pi \sqrt{2} \sigma)^{n_1+n_2} \Gamma\left(\frac{n_1-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_2-1}{2}\right)}.$$

Now transform the variables to

$$(27) \quad \begin{cases} \bar{x}'_2 = \bar{x}_2 - a; & \xi = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \\ \theta = \frac{s_2^2}{s_1^2}; & q = n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2. \end{cases}$$

Then it follows that

$$(28) \quad s_1^2 = \frac{q}{n_1 + n_2 \theta}, \quad s_2^2 = \frac{\theta q}{n_1 + n_2 \theta}$$

while it is not difficult to show that

$$(29) \quad n_1(\bar{x}_1 - a)^2 + n_2(\bar{x}_2 - a)^2 = \left(\sqrt{n_1 + n_2} \bar{x}'_2 + \xi \sqrt{q} \sqrt{\frac{n_1}{n_2}} \right)^2 + \xi^2 q.$$

Further the Jacobian of the transformation gives

$$(30) \quad \left| \frac{\partial(\bar{x}_1, \bar{x}_2, s_1, s_2)}{\partial(\bar{x}'_2, \xi, q, \theta)} \right| = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}} \theta^{-\frac{1}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-1} q^{\frac{1}{2}}.$$

Hence the probability law of $\bar{x}'_2, \xi, q, \theta$ is

$$C_0 \frac{1}{4} \sqrt{\frac{n_1+n_2}{n_1 n_2}} q^{\frac{n_1+n_2-3}{2}} \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1+n_2 \theta) e^{-\frac{(\sqrt{n_1+n_2} \bar{x}'_2 + \xi \sqrt{q} \sqrt{\frac{n_1}{n_2}})}{2\sigma^2}} e^{-\frac{q(1+\xi^2)}{2\sigma^2}} \quad (31).$$

We may now integrate for \bar{x}'_2 between the limits $-\infty$ and $+\infty$ and shall merely have in place of the \bar{x}'_2 term a factor $\sqrt{\frac{n_1+n_2}{2\pi}} \sigma$. Hence the probability law of ξ, q and θ is

$$C_0 \frac{\sigma}{4} \sqrt{\frac{2\pi}{n_1 n_2}} \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1+n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2-2}{2}} q^{\frac{n_1+n_2-3}{2}} e^{-\frac{q(1+\xi^2)}{2\sigma^2}} \quad (32).$$

To integrate for q between the limits 0 and $+\infty$ we write $u = q(1+\xi^2)(2\sigma^2)^{-1}$ and find the probability law of ξ and θ

$$F_1(\xi \theta) = C_0 \sigma^{n_1+n_2} 2^{\frac{n_1+n_2-4}{2}} \sqrt{\frac{\pi}{n_1 n_2}} \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1+n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2-2}{2}} (1+\xi^2)^{-\frac{n_1+n_2-1}{2}} \int_0^\infty u^{\frac{n_1+n_2-3}{2}} e^{-u} du.$$

which on substituting $\Gamma\left(\frac{n_1+n_2-1}{2}\right)$ for the u -integral and using the value for C_0 given above results in

$$\frac{n_1^{\frac{n_1-1}{2}} n_2^{\frac{n_2-1}{2}} \Gamma\left(\frac{n_1+n_2-1}{2}\right)}{\sqrt{\pi} \Gamma\left(\frac{n_1-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_2-1}{2}\right)} \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1+n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2-2}{2}} (1+\xi^2)^{-\frac{n_1+n_2-1}{2}} \quad (33).$$

If now we substitute for $\xi, t = \sqrt{n_1+n_2-2} \xi$, we see on comparison with (20) and (24) that

$$F(t, \theta) = F_1\left(\frac{t}{\sqrt{n_1+n_2-2}}, \theta\right) = f(t) \varphi(\theta) \quad (34).$$

That is to say the simultaneous distribution of t and θ is identical with the product of their independent distributions, or in pairs of random samples Σ_1 and Σ_2 from a common normal population,

the two coefficients t and θ are completely uncorrelated. This result (34) combined with the previous result (25) is of considerable interest. $F(t, \theta)$ may be represented by a two-dimensional density field; for a given value of θ the change in t follows a Pearson Type VII law; for a given t the change in θ follows a Type VI law. As there is no correlation, the array distributions are homoscedastic and the same as the marginal distributions.

As shown by (18) the contours of constant λ_H are closed oval curves in the field, not corresponding exactly to the contours of equal density, but tending to these as n_1 and n_2 are increased. The chance of obtaining in pairs of samples a value of λ_H less than any given amount, P_{λ_H} is the integral of the density represented by (33) taken outside the corresponding λ_H -contour represented by (18). We shall discuss below an approximate method of obtaining this probability integral.

A limiting case of the problem we have considered will occur if we make $n_2 \rightarrow +\infty$, but keep n_1 finite. The second sample then becomes indistinguishable from an infinite population, so that $\bar{x}_2 = a$ and $s_2 = \sigma$. In fact we are now testing a simple hypothesis, namely that a sample of $n (= n_1)$ with mean $\bar{x} (= \bar{x}_1)$ and standard deviation $s (= s_1)$ has been drawn from a normal population with mean and standard deviation of a and σ respectively. It is not difficult to show that the limiting form as $n_2 \rightarrow \infty$ of λ_H of (18) becomes

$$(35) \quad \lambda'_H = \left(\frac{s}{\sigma}\right)^n e^{-\frac{n}{2} \left\{ \frac{(\bar{x}-a)^2 + s^2}{\sigma^2} - 1 \right\}}.$$

This is the problem we have considered elsewhere¹). In that case $m = \bar{x} - a$ and s^2 are two completely independent criteria and their sampling distribution is represented by a density field in which the distribution of m for a given s is a normal curve and that of s for a given m a Pearson Type III curve. The contours of λ'_H were also closed oval curves tending to correspond to the contours of equal density as n was increased. In our paper we gave diagrams of these contours and also tables of P_{λ} , the

¹) *Biometrika*, XXA. pp. 187—189. The hypothesis was there termed Hypothesis A. Equation (35) above corresponds to (XIX) of our previous paper.

chance of drawing a sample with λ less than any given value. These tables form what might be termed the marginal distributions, corresponding to $n_2 \rightarrow \infty$ or $n_1 \rightarrow \infty$, of the tables required in our present problem. They involved considerable computation using quadratures; we shall be content in the present paper with a more approximate solution of the problem of finding P_{λ_H} for the case of two samples.

III. The Moments of the distribution of λ_H and approximations to P_{λ_H} .

It is not difficult to find the moment coefficients of the distribution of λ_H obtained when repeated pairs of random samples are drawn from the same normal population. We shall first obtain these coefficients, and then outline the stages which have led to the provisional tables connecting λ_H and P_{λ_H} which we give at the end of this paper. A more detailed analysis of the problem is required, but this we must leave for a later paper.

We have the two relations

$$\lambda_H = (n_1 + n_2)^{\frac{n_1+n_2}{2}} \theta^{\frac{n_2}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2}{2}} (1 + \xi^2)^{-\frac{n_1+n_2}{2}} \quad (36)$$

and

$$F_1(\xi, \theta) = C_0 \theta^{\frac{n_2-3}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-\frac{n_1+n_2-2}{2}} (1 + \xi^2)^{-\frac{n_1+n_2-1}{2}} \quad (37)$$

where C_0 is the constant term given in (33) above. Denote by μ'_k the k th moment-coefficient of λ_H about zero, then

$$\begin{aligned} \mu'_k &= \int_0^{\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} F_1(\xi, \theta) \lambda_H^k d\theta d\xi = \\ &= C_0 (n_1 + n_2)^{\frac{n_1+n_2}{2}} \int_0^{\infty} \theta^{\frac{(k+1)n_2-3}{2}} (n_1 + n_2 \theta)^{-\frac{(k+1)(n_1+n_2)-2}{2}} d\theta \int_{-\infty}^{+\infty} (1 + \xi^2)^{-\frac{(k+1)(n_1+n_2)-1}{2}} d\xi = \\ &= C_0 (n_1 + n_2)^{\frac{n_1+n_2}{2}} I_{\theta}^k I_{\xi}^k. \end{aligned}$$

The integrals I_θ and I_ξ may be calculated separately. Writing

$u = \frac{n_1}{n_1 + n_2 \theta}$ we obtain a Beta Function for the first, or

$$(38) \quad I_\theta = n_1^{-\frac{(k+1)n_2-1}{2}} n_2^{-\frac{(k+1)n_2-1}{2}} B\left(\frac{(k+1)n_1-1}{2}, \frac{(k+1)n_2-1}{2}\right)$$

and writing $v = \frac{1}{1 + \xi^2}$,

$$(39) \quad I_\xi = B\left(\frac{(k+1)(n_1+n_2)-2}{2}, \frac{1}{2}\right).$$

From these results it follows that

$$(40) \quad \mu'_k = \left(\frac{(n_1+n_2)^{n_1+n_2}}{n_1^{n_1} n_2^{n_2}}\right)^{\frac{k}{2}} \frac{\Gamma\left(\frac{(k+1)n_1-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{(k+1)n_2-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_1+n_2-1}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{(k+1)(n_1+n_2)-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_1-1}{2}\right) \Gamma\left(\frac{n_2-1}{2}\right)}$$

The limiting value of (40) in two cases is of interest.

(1) When n_1 and n_2 both become very large. Using the first approximation given by Stirling's Formula or,

$$(41) \quad \Gamma(x) \sim x^{x+\frac{1}{2}} e^{-x} \sqrt{2\pi}$$

it is found that as n_1 and $n_2 \rightarrow \infty$

$$(42) \quad \mu'_k \rightarrow \frac{1}{k+1}$$

uniformly whatever be k . We conclude that the frequency distribution of λ tends at the same time to a limiting form having its k th moment equal to $(k+1)^{-1}$. It is the so called Rectangular Distribution, or $f(\lambda) = \text{constant}$. We therefore appear justified in assuming that when comparing large samples, the frequency distribution of λ_H will tend to this form, or P_{λ_H} will approach λ_H in value.

(2) When n_2 becomes very large, n_1 remaining finite. Making $n_2 \rightarrow \infty$ in (40) and using (41) we find that

$$\mu'_k \rightarrow \frac{\Gamma\left(\frac{(k+1)n_1-1}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{n_1-1}{2}\right)} (k+1)^{-\frac{(k+1)n_1}{2}} \left(\frac{2e}{n_1}\right)^{\frac{k n_1}{2}} \quad (43)$$

an expression giving the moment coefficients of the distribution of λ whose probability integral we have tabled in our earlier paper.

In order to obtain some appreciation of the rapidity with which the distribution of λ_H in the two sample problem tends to the rectangular form, we have calculated from (40) the frequency constants: mean λ , standard deviation of λ , β_1 and β_2 , for a variety of values of n_1 and n_2 ¹⁾. These are given in Table I. For the rectangular distribution these constants have values

Mean = 0.5, Standard deviation = $\frac{1}{\sqrt{12}} = 0.288675$; $\beta_1 = 0$;
 $\beta_2 = 1.8$.

We have also calculated certain values from (43). All constants approach the values for the rectangular distribution as n_1 and n_2 are increased, but without further analysis it is not possible to say at what point it would be justifiable to use the equality $P_{\lambda_H} = \lambda_H$. We propose here only to set out briefly the steps in reasoning which have led us to the rough Tables II and III given below.

(a) As λ_H must lie between 0 and 1 we assume that its distribution can be represented approximately by the law

$$f(\lambda) = \frac{\Gamma(p+q)}{\Gamma(p)\Gamma(q)} \lambda^{p-1} (1-\lambda)^{q-1} \quad (44)$$

The rectangular distribution is a special case of this, arising when $p = q = 1$.

(b) The p and q of (44) may be expressed in terms of the mean, m_1 , and the variance, m_2 , of the distribution; namely

$$p = \frac{m_1}{m_2} \{m_1(1-m_1) - m_2\}, \quad q = \frac{1-m_1}{m_2} \{m_1(1-m_1) - m_2\}. \quad (45)$$

¹⁾ Mean $\lambda = \mu'_1$, Standard deviation = $\sqrt{\mu'_2 - \mu_1'^2}$, and if μ_2 , μ_3 and μ_4 are the second, the third and fourth moment-coefficients of λ referred to the mean,

$$\beta_1 = \frac{\mu_3}{\mu_2^2}, \quad \beta_2 = \frac{\mu_4}{\mu_2^3}.$$

(c) Substituting in (45) the true means and standard deviations of the distributions given in the third and fourth columns of Table I, that is putting $m_1 = \text{Mean } \lambda_H$, $m_2 = \mu_2 - (\text{Mean } \lambda_H)^2$ we have calculated p and q in each case.

TABLE I.
Moment Coefficients of λ_H Distribution.

		True values from equations (40) and (43)				Values from equations (46)	
n_1	n_2	Mean λ	σ_λ	β_1	β_2	β_1	β_2
5	5	0.4222	0.2986	0.0787	1.8257	0.0779	1.8252
5	10	0.4403	0.2973	0.0451	1.8001	0.0450	1.8001
5	20	0.4459	0.2969	0.0365	1.7942	0.0367	1.7943
5	50	0.4477	0.2968	0.0339	1.7924	0.0342	1.7926
5	∞	0.4481	0.2968	0.0334	1.7920	0.0338	1.7922
10	10	0.4634	0.2946	0.0166	1.7863	0.0165	1.7863
10	20	0.4718	0.2935	0.0098	1.7855	0.0098	1.7855
10	50	0.4749	0.2931	0.0077	1.7856	0.0077	1.7856
10	∞	0.4757	0.2930	0.0072	1.7857	0.0072	1.7857
20	20	0.4823	0.2918	0.00383	1.7879	0.00382	1.7880
20	50	0.4869	0.2911	0.00208	1.7901	0.00208	1.7901
20	∞	0.4882	0.2909	0.00168	1.7908	0.00169	1.7908
50	50	0.4930	0.2900	0.00059	1.7940	0.00058	1.7941
50	∞	0.4954	0.2896	0.00026	1.7959	0.00026	1.7959
∞	∞	0.5000	0.2887	0.00000	1.8000	0.00000	1.8000

(d) The curves represented by (44) have the following values for β_1 and β_2 ,

$$(46) \quad \begin{cases} \beta_1 = \frac{4(p-q)^2(p+q+1)}{pq(p+q+2)^2} \\ \beta_2 = \frac{3\beta_1(p+q+2) + 6(p+q+1)}{2(p+q+3)} \end{cases}$$

These have been calculated using the p 's and q 's of (c), and the resulting values are given in the 7th and 8th columns of Table I.

(e) It will be seen that these latter values agree to the 4th decimal place very closely with the true values of β_1 and β_2 for the λ_H distribution calculated from the moment coefficients of equations (40) and (43) and given in the 5-th and 6-th columns of the table. This suggests that the curves (44) may give a reasonable fit to the true λ_H distribution, although a more exact confirmation is clearly required in the critical region near $\lambda_H = 0$. A partial check on this point is described below.

(f) Using these curves (44) we have computed for several different sizes of the samples the values of λ_H for which

$$P_{\lambda_H} = \int_0^{\lambda_H} f(\lambda) d\lambda = 0.05 \quad \text{and} \quad 0.01.$$

These are given in Tables II and III. The computation was rendered easy because in all cases the value of q differed only slightly from unity, and therefore in the neighbourhood of $\lambda_H = 0$ we obtain approximately from (44)

$$P_{\lambda_H} = \frac{\Gamma(p) \Gamma(q) \lambda^p}{\Gamma(p+q) P} \tag{47}$$

(g) For the limiting cases n_2 (or n_1) = ∞ we may compare the values of λ_H corresponding to $P_\lambda = 0.05$ and 0.01 computed in this approximate manner with those obtained from the Tables¹⁾ in our earlier paper. The latter were obtained by a quadrature of the density field lying inside the oval λ contours in the (m, s) field i. e. by a completely independent and exact method. They are given in brackets in the marginal columns of Tables II and III, and will be seen to agree very closely with the results of our present approximation.

(h) As a further check on the accuracy of this method of approximation, the case $n_1 = n_2 = 5$ was taken and the integration of $F(t, \theta)$ outside certain of the λ_H contours was carried out by using quadratures. Hence it was found that,

¹⁾ *Biometrika* XX A, pp. 238-240.

TABLE II.

Values of λ_H giving $P_{\lambda_H} = 0.05$.

		n_1				
		5	10	20	50	∞
n_2	5	0.0167 (0.0169)	0.0222	0.0241	0.0247	0.0248 (0.0247)
	10	0.0222	0.0312	0.0349	0.0364	0.0368 (0.0367)
	20	0.0241	0.0349	0.0401	0.0425	0.0432 (0.0431)
	50	0.0247	0.0364	0.0425	0.0459	0.0473 (0.0474)
	∞	0.0248 (0.0247)	0.0368 (0.0367)	0.0432 (0.0431)	0.0473 (0.0474)	0.0500

TABLE III.

Values of λ_H giving $P_{\lambda_H} = 0.01$.

		n_1				
		5	10	20	50	∞
n_2	5	0.0019 (0.0019)	0.0029	0.0033	0.0034	0.0034 (0.0033)
	10	0.0029	0.0048	0.0058	0.0061	0.0062 (0.0062)
	20	0.0033	0.0058	0.0071	0.0078	0.0080 (0.0079)
	50	0.0034	0.0061	0.0078	0.0088	0.0092 (0.0092)
	∞	0.0034 (0.0033)	0.0062 (0.0062)	0.0080 (0.0079)	0.0092 (0.0092)	0.0100

for $P_{\lambda_H} = 0.01$, $\lambda_H = 0.00193$ against the approximate value of 0.00186.

for $P_{\lambda_H} = 0.05$, $\lambda_H = 0.0169$ against the approximate value of 0.0167.

The former values are given in brackets in the cells corresponding to $n_1 = n_2 = 5$ of Tables II and III.

(k) As far as can be judged from the frequency constants the distribution of λ for the limiting case $n_2 = \infty$ and also for the special case $n_1 = n_2 = 5$ are of the same general type as in the other cases. The agreement therefore, described in (g) and (h) above, between the true values of λ found by quadrature and those found by using the curves (44), suggests that Tables II and III may be taken throughout as giving adequate approximations to the values of λ_H corresponding to $P_\lambda = 0.05$ and 0.01.

IV. An illustrative example.

In our previous paper we took as an example the variations in Cephalic Index (breadth to length ratio $\times 100$) measured on each of two series of 10 human skulls¹⁾, namely

Series 1,

$$74.1; 77.7; 74.4; 74.0; 73.8; 72.2; 75.2; 78.2; 77.1; 78.4$$

$$n_1 = 10; \quad \bar{x}_1 = 75.51; \quad s_1 = 2.059$$

Series 2,

$$66.7; 69.4; 67.8; 73.2; 79.3; 80.7; 64.9; 82.2; 72.4; 78.1$$

$$n_2 = 10; \quad \bar{x}_2 = 73.47; \quad s_2 = 5.942.$$

We then inquired whether it was likely, as far as the cephalic index was concerned, that these two sets of skulls could be random samples from a population in which the mean cephalic index was 75.06 and the standard deviation 2.68, and concluded that it was very probable in the first case ($P_\lambda = 0.504$), but highly improbable in the second ($P_\lambda < 0.0001$). We were then testing two „simple“ hypotheses.

We may now proceed to test the „composite“ hypothesis that these two samples have come from the same population, without

¹⁾ *Biometrika*, XX A, p. 202.

specifying what that population may be, except that it will be assumed that the distribution of cephalic index does not differ so much from normality as to invalidate the test¹). On combining the two samples it is found that $s_0 = 4.562$, and hence

$$\lambda_H = \left(\frac{s_1 s_2}{s_0^2} \right)^{10} = 0.00492.$$

Table III indicates that this value corresponds very closely to $P_{\lambda_H} = 0.01$; that is to say only once in a hundred times should we expect our criterion to have as low or a lower value were the hypothesis tested true. We should therefore conclude that it was very unlikely that the two series of skulls came from the same population. The values of t and θ for this pair of samples are

$$t = 0.973, \quad \theta = 8.328.$$

The point $R(t, \theta)$ representing the samples has been plotted in the accompanying diagram, and also a curve representing (though not drawn to scale) the member of the family of contours (18) for which $\lambda_H = 0.00492$. Then P_{λ_H} is the integral of the function $F(t, \theta)$ of (33) and (34) taken throughout the region of the field lying outside this contour.

Let us also consider the hypotheses H_1 and H_2 . Equation (23) gives $\lambda_{H_1} = 0.00822$; this is constant for sample points lying not only on the line NRN through R , parallel to the axis of t , but also on a second parallel QMQ . The latter corresponds to certain pairs of samples in which s_1 is greater than s_2 , and $\theta = 0.120$. $P_{\lambda_{H_1}}$ is the integral of $F(t, \theta)$ over (a) the region for which $\theta \geq 8.328$ and (b) the region for which $\theta \leq 0.120$, that is to say over the two shaded areas of the diagram. It is found that $P_{\lambda_{H_1}} = 0.0042$ ²). We should therefore conclude that it was ex-

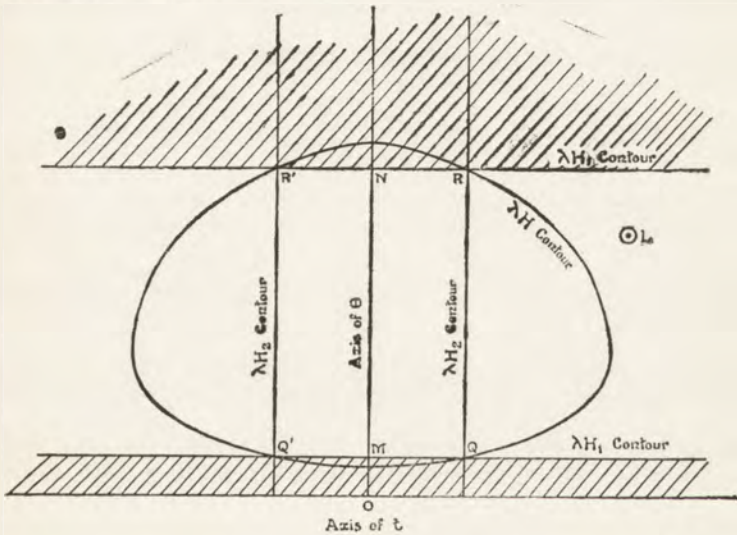
¹) The sensitiveness of the test to deviations from normality will require further consideration.

²) Using Fisher's transformation and the 2 tables referred to in the footnote on page 75 above we can only find that the integral over each shaded area is less than 0.01. The value 0.0042 was found by making the transformation $u = \frac{1}{1+\theta}$ and using unpublished tables of the incomplete Beta Function Integral.

tremely unlikely that the two samples came from populations with a common standard deviation, and as the test of hypothesis H_2 is based on the assumption that the populations sampled have a common standard deviation, we should hardly go on to examine this. If however we had some a priori grounds for believing that $\sigma_1 = \sigma_2$, and that therefore the observed difference between s_1 and s_2 was just a very abnormal chance fluctuation, then we might continue and examine hypothesis H_2 , and should find $\lambda_{H_2} = 0.599$, and entering Student's Tables with $t = 0.973$, $n = 18$ ¹⁾, $P_{\lambda_{H_2}} = 0.343$. That is to say we should conclude that there was nothing exceptional in the difference in mean cephalic indexes. It will be noted that

$$\lambda_H = 0.00492 = \lambda_{H_1} \lambda_{H_2} = 0.00822 \times 0.599$$

as follows from (25).



It may appear at first to be illogical that while $P_{\lambda_H} = 0.01$, $P_{\lambda_{H_1}} = 0.0042$. But it must be remembered that in testing hypothesis H_1 we are only questioning whether it is likely that the population standard deviations are the same. Consequently a pair of samples corresponding to a point (t, θ) at L in the diagram

¹⁾ *Metron*, V, 3. p. 26.

would be more favourable to the hypothesis H_1 than the observed pair at R , and the region of the field in the neighbourhood of L is excluded in obtaining the $P_{\lambda_{H_1}}$ integral. But in testing the hypothesis H we are examining the two samples as a whole; the point L corresponds it is true to a lower value of θ but to a larger value of t than does R . It lies on an outer likelihood (λ_H) contour to R , and the region in which it lies is included in the P_{λ_H} integral. If the essential difference in the nature of the hypotheses H and H_1 is understood, it will be seen that there is no inconsistency in the fact that for the pair of samples used in our illustration $P_{\lambda_H} > P_{\lambda_{H_1}}$.



Über die Glaubwürdigkeit gewisser Hypothesen.

Von

Stanisław Kołodziejczyk (Warszawa).

(Biometrisches Laboratorium, Nencki's Institut, Gesellschaft der Wissenschaften in Warschau).

Im folgenden will ich einen allgemeinen Satz über die Grenze der Glaubwürdigkeit auf zwei Spezialfälle, die von praktischer Bedeutung sind, anwenden.

Es sei eine Reihe von N unabhängigen Losungen aus einem Kollektiv von Merkmalen

$$(1) \quad x_1, x_2, \dots, x_k$$

ausgeführt. Bezeichnen wir, für eine jede von diesen Losungen, mit p_i die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ihr Resultat das Merkmal x_i aufweist und mit n_i die Anzahl derjenigen Losungen aus der betrachteten Reihe, die dasselbe Resultat x_i gegeben haben. Es sei noch $q_i = \frac{n_i}{N}$. Es ist klar, dass

$$(2) \quad \sum_{i=1}^k p_i = \sum_{i=1}^k q_i = 1.$$

Wir betrachten nun $s < k - 1$ unabhängige Funktionen

$$(3) \quad \theta_i(p_1, p_2, \dots, p_k); \quad i = 1, 2, \dots, s,$$

die im Punkte $p_j = q_j (j = 1, 2, \dots, k)$ in eine Potenzreihe entwickelbar sind, also

$$(4) \quad \theta_i = \theta_{i0} + \sum_{j=1}^k a_{ij}(p_j - q_j) + R_i,$$

wo

$$(5) \quad \theta_{i0} = \theta_i(q_1, q_2, \dots, q_k)$$

ist. Die Funktionen θ_i sind unabhängig von N .

Wir wollen nun annehmen, dass die Zahl der ausgeführten Losungen ins Unendliche wächst, und zwar auf diese Weise, dass die Zahlen q_i konstant bleiben.

Es sei H eine Hypothese, die dem Ausdrücke

$$(6) \quad \sqrt{N}(\theta_i - \bar{\theta}_i)$$

einen konstanten, von N unabhängigen Wert $\bar{\theta}_i$ zuschreibt. Nun gilt der folgende Satz¹⁾: Wenn N ins Unendliche wächst, dann nähert sich λ — die Glaubwürdigkeit der Hypothese H — einer Grenze, nämlich

$$(7) \quad \lim_{N \rightarrow \infty} \lambda = e^{-\chi_1^2},$$

wo χ_1^2 das Minimum des Ausdrückes

$$(8) \quad \chi^2 = N \sum_{i=1}^k \frac{(p_i - q_i)^2}{q_i},$$

berechnet bei den Nebenbedingungen

$$(9) \quad \sum_{i=1}^k p_i = 1,$$

$$\sqrt{N} \sum_{j=1}^k a_{ij}(p_j - q_j) = \bar{\theta}_i; \quad i = 1, 2, \dots, s,$$

bedeutet.

Wenn $s = 1$, ist, so ergibt es sich, mittels einer leichten Rechnung, dass

$$(10) \quad \chi_1^2 = \frac{\bar{\theta}^2}{\sigma^2},$$

wo

$$(11) \quad \sigma^2 = \sum_{i=1}^k q_i a_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k q_i a_i \right)^2 = \sum_{i=1}^k q_i \left(a_i - \sum_{j=1}^k q_j a_j \right)^2.$$

¹⁾ J. Neyman: „Sur la limite de la vraisemblance de l'hypothèse“. Comptes Rendues Bd. 188; S. 1360.

Siehe auch: J. Neyman, „Contribution to the theory of certain test criteria“, Bulletin der XVIII. Session des Internationalen Statistischen Instituts, Warszawa 1929.

Ich will nun diese Formeln auf zwei spezielle Hypothesen anwenden.

1) Es sei eine Korrelationsstafel gegeben. Auf der X -Achse werden alle möglichen Werte des einen Merkmals aufgetragen

$$(12) \quad x_1, x_2, \dots, x_l,$$

auf der Y -Achse, diejenigen des zweiten

$$(13) \quad y_1, y_2, \dots, y_m.$$

Es wird durch p_{ik} die Wahrscheinlichkeit für das Hervortreten des Merkmalpaars (x_i, y_k) und durch n_{ik} die Anzahl derjenigen von den N unabhängigen Lösungen, die das Resultat (x_i, y_k) ausgewiesen haben, bezeichnet. Es sei noch

$$(14) \quad \begin{aligned} q_{ik} &= \frac{n_{ik}}{N}, \\ \bar{y}_i &= \frac{\sum_{k=1}^m y_k p_{ik}}{\sum_{k=1}^m p_{ik}}, \\ s &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m p_{ik} (\bar{y}_i - \bar{y})^2, \\ S &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m p_{ik} (y_k - \bar{y})^2. \end{aligned}$$

Das Korrelationsverhältniss von Y auf X , ist nun durch die Formel

$$(15) \quad \eta = \frac{s}{S}$$

gegeben. Wir bezeichnen weiter durch η_0 , den Wert von η für $p_{ik} = q_{ik}$ ($i = 1, 2, \dots, l$; $k = 1, 2, \dots, m$) und betrachten die Hypothese H_1 , die dem Ausdrucke

$$(16) \quad \sqrt{N}(\eta^2 - \eta_0^2)$$

einen konstanten, von N unabhängigen Wert $\bar{\theta}^2$ zuschreibt. Wir wählen nun das Koordinatensystem so, dass

$$(17) \quad \bar{y}_0 = \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} y_k = 0$$

ist und messen die y_{ik} durch ihre mittleren Abweichungen, was der Annahme

$$(18) \quad S_0^2 = \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} (y_k - \bar{y}_0)^2 = 1$$

entspricht.

Der oben angeführte Satz lässt sich auf die Hypothese H_1 anwenden und eine leichte Rechnung ergibt die Formel

$$(19) \quad \chi_1^2 = \frac{\sqrt{N}(\eta^2 - \eta_0^2)}{\eta_{20}^4 \eta_{04} - 4\eta_{20}^3 \eta_{13} + 2(\eta_{20}^2 + 2)\eta_{22} - 4\eta_{31} + \eta_{40}},$$

wo

$$(20) \quad \eta_{rs} = \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} \bar{y}_{i0} y_k^r; \quad \bar{y}_{i0} = \frac{\sum_{k=1}^m q_{ik} y_k}{\sum_{k=1}^m q_{ik}}$$

ist. Nun kann der Ausdruck $e^{-\frac{\chi_1^2}{2}}$ als eine Annäherung der Glaubwürdigkeit der Hypothese H_1 angesehen werden.

2) Der zweite Spezialfall, den ich hier betrachten will, betrifft die Hypothese H_2 über die Geradlinigkeit der Regression. Wir behalten hier alle vorigen Bezeichnungen. Die Regression von Y auf X ist geradlinig, wenn

$$(21) \quad \bar{y}_i - \bar{y} = a(x_i - \bar{x}); \quad a = \text{const.},$$

wobei

$$(22) \quad \bar{x} = \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m p_{ik} x_i$$

ist.

Um auf die Hypothese H_2 den angeführten Satz anwenden zu können, brauchen wir nur die Hypothese mittels einer oder mehrerer unabhängigen Gleichungen ausdrücken. Bekanntlich ist es notwendig und hinreichend dafür, dass die Regression geradlinig ist, dass das Korrelationsverhältniss gleich dem absoluten Werte des Korrelationskoeffizienten ist, also dass

$$(23) \quad \eta^2 = r^2,$$

wo

$$(24) \quad r = \frac{\sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m p_{ik} x_i y_k - \bar{x} \bar{y}}{S_x S_y}$$

und S_x und S_y die mittleren Abweichungen von X bzw. Y bedeuten.

Wir können nun den Ausdruck

$$(25) \quad \varrho = \frac{\eta^2}{r^2} = \frac{s^2 S_x^2}{\left[\sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m p_{ik} (x_i - \bar{x}) (y_k - \bar{y}) \right]^2}$$

betrachten, und, indem wir ihm den Wert 1 zuschreiben, unserer Hypothese H_2 mittels einer einzigen Gleichung eine Aussage geben. Es sei $\varrho = \varrho_0$ für $p_{ik} = q_{ik}$ und $\sqrt{N}(1 - \varrho_0) := \bar{\theta}$. Dann ist die Hypothese H_2 mit der Aussage

$$(26) \quad \sqrt{N}(\varrho - \varrho_0) = \bar{\theta}$$

identisch. Der Grenzwertsatz lässt sich nun auf die Hypothese H_2 anwenden, und wenn wir noch, ohne wesentlicher Beschränkung der Allgemeinheit, voraussetzen, dass

$$(27) \quad \begin{aligned} \bar{x}_0 &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} x_i = 0, & \bar{y}_0 &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} y_k = 0, \\ S_{x_0}^2 &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} (x_i - \bar{x}_0)^2 = 1, & s_0 &= \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} (y_{i0} - \bar{y})^2 = 1, \end{aligned}$$

dann ergibt sich die Glaubwürdigkeit der betrachteten Hypothese gleich dem Ausdrucke $e^{-\frac{\chi^2}{2}}$, mit

$$(28) \quad \chi^2 = \frac{N(1 - \varrho_0)^2}{\varrho_0^2 \left(\sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} u_i^2 - 4 \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m q_{ik} u_i v_i \bar{y}_{i0} + 4 \sum_{i=1}^l \sum_{k=1}^m v_i^2 y_k^2 \right)}$$

und

$$(29) \quad \begin{aligned} u_i &= x_i^2 - \bar{y}_{i0}^2, \\ v_i &= \varepsilon x_i \sqrt{|\varrho_0|} - \bar{y}_{i0}, \end{aligned}$$

wobei $\varepsilon = \pm 1$ mit dem Zeichen des Korrelationskoeffizienten r , berechnet für $p_{ik} = q_{ik}$ ($i = 1, 2, \dots, l$; $k = 1, 2, \dots, m$), übereinstimmt.

(19)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{a^2 - b^2})$$

(20)

und $\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} - \sqrt{a^2 - b^2})$ die beiden ...
Hypothese H_1 mit der ...

(21)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{a^2 - b^2})$$

bestehen und haben wir hier den Wert $\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{a^2 - b^2})$...
Hypothese H_1 mit der ...

(22)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} - \sqrt{a^2 - b^2})$$

identisch. Der Grenzwert hat den Namen der Hypothese H_1 ...
annehmen, und wenn wir auch eine ...

(23)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{a^2 - b^2})$$

dann ergibt sich die Gleichung ...
...
...

(24)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{a^2 - b^2})$$

(25)

$$\frac{1}{2}(\sqrt{a^2 + b^2} - \sqrt{a^2 - b^2})$$

wobei $\epsilon = \pm 1$ mit dem Vorzeichen der ...
...
...

Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*

Von

Wiktorja S. Dembowska

Mit 11 Textabbildungen

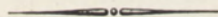
Sonderdruck aus
dem Archiv für
Mikroskopische Anatomie
und
Entwicklungsmechanik

Herausgegeben von

Wilhelm Roux†

unter Mitwirkung von **H. Braus** und **H. Spemann**

104. Band 1./2. Heft



Berlin

Julius Springer

1925

Studien über die
Reorganisation von Spinnweben

1904

Wilhelm S. Dornow

Mit 11 Textfiguren

Handelsdruckerei

der Stadt

Mikroskopische Technik

und

Entwicklungsmechanik

Leipzig

Wilhelm Engel

Verlag des Verlagsbuchhandels

104-Band 132. Heft

Leipzig

Verlag des Verlagsbuchhandels

1904

Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*¹⁾.

Von

Wiktorja S. Dembowska.

(Aus dem *M. Nencki*-Institut für experimentelle Biologie, Warschau.)

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Juni 1924.)

Bei der Teilung der Infusorien werden nicht nur Cilien und andere Körperorganellen neugebildet, sondern es findet eine weitgehende Reorganisation derjenigen Teile des Infusors statt, die nach der Teilung als direkte Überlieferungen des mütterlichen Organismus zurückgeblieben sind. Da die Körpergröße des Individuums nach stattgehabter Teilung auf die Hälfte reduziert wird, wobei das Infusor nach einiger Zeit vollkommen proportionell erscheint, leuchtet ein, daß die von dem mütterlichen Organismus überlieferten Organellen, wie Cilien, Peristom, kontraktile Vakuolen u. dgl. verhältnismäßig zu groß sind und einer Reduktion anheimfallen müssen. Aus Arbeiten von *Stein*, *Minkiewicz* und *Wallengren* wissen wir, daß diese Organellen vollständig resorbiert und durch entsprechende Neubildungen ersetzt werden. Besonders eingehend wurden diese Verhältnisse von *Wallengren* beschrieben, welcher die Reorganisation des Wimperkleides bei der Teilung mehrerer Hypotrichenarten untersuchte. Nach *Wallengren* erscheinen bei *Stylonychia mytilus* vor der Teilung zwei helle Felder, die auf der Ventralseite in der Nähe und etwas rechts von den entsprechenden Kernen liegen. In jedem entstehen bald je sechs etwas schiefe Längsspalten in der Pellicula, durch welche das Ektoplasma nach außen hervortritt und neue Cilienreihen bildet. In diesen sechs Spalten entstehen 18 Cirren, die anfangs eine Gestalt von dreieckigen mit der Spitze nach oben zugekehrten Membranellen haben, später aber eine länglich-konische Form annehmen, wobei sich jede zu einem streng bestimmten Körperpunkt begibt. Während der Entwicklung und des Auseinanderweichens neuer Cirren finden bedeutende Veränderungen im ventralen Wimperkleide statt, welches allmählich reduziert wird. Einige von neugebildeten Cirren entwickeln sich unmittelbar zu entsprechenden Cirren des jungen Infusors, andere ersetzen die mütterlichen Cirren, von welchen nach jeder Teilung das vordere Individuum

¹⁾ Am 13. Dezember 1923 der Warschauer Gesellschaft der Wissenschaften vorgelegt.

acht, das hintere dagegen zehn behält. Ganz analog erfolgt die Reorganisation der Randcirren. Das Peristom wird im hinteren Individuum neugebildet; im überlieferten Peristom des Vordertieres finden tiefgreifende Veränderungen statt. Die Mundöffnung wird geschlossen, und einige Zeit nimmt das Infusor keine Nahrung auf. Später verliert der rechte Peristomrand nach und nach seine scharfen Konturen und allmählich werden alle seine Membranellen sowie seine Wimpern durch neuentstandene ersetzt. Dennoch vermochte *Wallengren* das Verhalten des Peristoms bei *Stylonychia*-Teilung nicht genauer zu erforschen.

Schließlich wird das Kaudalende des Hintertieres von dem übrigen Körper durch eine scharfe Linie abgetrennt und es fällt allmählich der Resorption anheim.

In analoger Weise ist die Regeneration bei den Metazoen mit einer Resorption und einem Umbau vieler Organe verbunden. Dies folgt u. a. aus den Arbeiten von *Driesch* an *Tubularia*, *Bartsch* an *Planarien*, *Czwiklitzer* an *Ophryotrocha puerilis*, *Korschelt* an *Lumbriciden*, *Nusbaum* und *Oxner* an *Nemertinen*, *Bordage* an *Orthopteren*, abermals *Driesch* an *Clavellina* u. dgl. mehr. In allen diesen Fällen werden die zurückgebliebenen Organe rückgebildet, wobei sie das Material liefern, aus welchem sich neue Teile entwickeln.

Was die Protozoen anbelangt, sind bei denselben die Reorganisationsvorgänge recht wenig bekannt. Die Teilung ist immer mit Reorganisation verbunden, da ja jedes Tochttertier die ihm fehlende Körperhälfte mit ihren sämtlichen Organellen regenerieren muß. Prinzipiell bleibt also das Problem der Reorganisation sowohl nach normaler Teilung, wie auch im Regenerationsfalle das nämliche. Schon *Balbani* erwähnt in seinen Arbeiten über die Regeneration bei *Stentor* die Reduktion und Umlagerung unproportionell großer Körperteile, die nach der Operation zurückbleiben. Jedoch vermochte ich genauere Angaben über die Analogie beider Prozesse, Regeneration und Ontogenese bei den Protozoen, nirgends zu finden und eben diese Lücke auszufüllen bezweckt die vorliegende Arbeit.

Methodik.

Die Versuche habe ich an *Stylonychia mytilus*, auf Kulturen von *Colpidium* aufgezogen, ausgeführt. Anfangs habe ich die Infusorien nach dem von *Ishikawa* angegebenen Verfahren narkotisiert, jedoch bald diese Methode aufgegeben. *Stylonychia* ist viel zu empfindlich gegen Chloroform und geht sehr leicht zugrunde. Außerdem sind die verschiedenen Entwicklungsstadien in verschiedenem Grade widerstandsfähig: besonders empfindlich sind die Tiere während der Teilung. Diese letzteren unterliegen der Narkose in verschiedenem Grade, je nach dem Körperpunkt. Das Narkotisieren würde demnach die Gleichförmigkeit der Versuchsbedingungen beeinträchtigen und die Deutung der gewonnenen Tatsachen dadurch wesentlich erschweren.

Alle Versuche wurden also an lebenden, nicht narkotisierten Infusorien ausgeführt. Das Durchschneiden in gewünschter Richtung einer sich lebhaft bewegenden *Stylonychia* bereitet keine geringe Schwierigkeit und es blieb mir nur übrig mehrere Tiere auf einmal zu operieren und aus erhaltenem Material die zufällig entsprechend durchtrennten Individuen auszulesen.

Nach erster, durch die Operation bewirkter Erregung, bewegt sich gewöhnlich das Tierchen immer langsamer, bis es vollkommen stehen bleibt, um in dieser Stellung bis zum Abschluß des Regenerationsvorganges zu verharren. Dieser Umstand erleichtert bedeutend die Beobachtung. Nachdem die Regulation zu Ende gekommen ist, kehrt das Infusor ganz spontan zur ursprünglichen Beweglichkeit zurück. Vor der Operation erhielten die Tiere 24 Stunden lang keine Nahrung, zwecks möglicher Erhöhung der Körperdurchsichtigkeit. Trotzdem störten oft die im Plasma liegenden Körnchen die Beobachtung in hohem Maße. Als Messer diente mir eine flachgeschmiedete, geschliffene und gehärtete Stahlnadel, bzw. in einigen Fällen ein Kapillarröhrchen oder eine Glasnadel.

Beschreibung der Versuche.

I. Operationen am ausgewachsenen Individuum.

Abb. 1 veranschaulicht die allgemeine Anordnung wichtigster Körperteile von *Stylonychia* von der Aboralseite gesehen. 1, 2, 3, 5, 6, 8, 15 und 16 entsprechen den acht Stirncirren. 9, 11, 12, 13 und 17 bezeichnen die fünf Bauchcirren und NN 4, 7, 10, 14 und 18 die fünf Analcirren.

1. Querschnitt durch die Mitte des Körpers

(Abb. 1).

Das vordere Schnittstück enthielt den Vorderkern, das Peristom und die acht Stirncirren. Das hintere Schnittstück führte den hinteren Kern, fünf Bauch- und fünf Analcirren sowie die drei Schwanzborsten.

Bei diesem Operationstypus bleibt die vordere, das Peristom enthaltende Hälfte einige Zeit sehr beweglich, sogar beweglicher als das normale Tier, da jetzt die starken Peristomwimpern einen verhältnismäßig geringeren Widerstand zu überwinden haben. Schließlich bleibt sie doch still stehen. Das hintere Schnittstück dagegen stellt schon sehr bald seine Bewegung ein, so daß der ganze Regenerationsverlauf ohne Schwierigkeit zu beobachten ist.

Ich beginne mit der Beschreibung des Verhaltens des *hinteren Schnittstückes* (Abb. 2).

Bald nach der Operation werden die Wundränder etwas abgerundet, und das Stück nimmt allmählich die normale *Stylonychia*-Form an (Abb. 2b). Die beiden Reihen der Randcirren krümmen sich etwas ein und stoßen vorn zusammen. Der Kern begibt sich rückwärts,

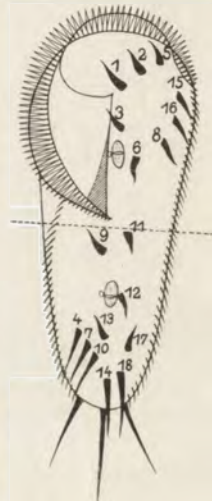


Abb. 1. Anordnung der Cirren im normalen Infusor, von der aboralen Seite gesehen.

gegen die Mitte des Stückes. Nach 2 Stunden entsteht rechts vom Kern (von der aboralen Seite gesehen) ein rundliches Feld, welches infolge seiner Helligkeit von dem umgebenden Plasma etwas, wenn auch nicht besonders scharf, absticht. Bei aufmerksamer Beobachtung bemerkt man bald in diesem Felde sechs längliche, parallele, etwas schief gelegene Furchen. Es sind dies die schon früher erwähnten Spalten in der Pellicula, durch welche das die neuen Cirri bildende Ektoplasma hervorquillt. Nach $2\frac{1}{2}$ Stunden seit dem Versuchsbeginn sieht man deutlich 18 winzige Cirri, die in den Furchen des Regenerationsfeldes liegen, und zwar genau in derselben Anordnung als dies bei der normalen Teilung (*Wallengren*) der Fall ist.

In der Abb. 3a bezeichnen die römischen Zahlen die sechs Spalten des Regenerationsfeldes. Die arabischen Ziffern 1—18 entsprechen den

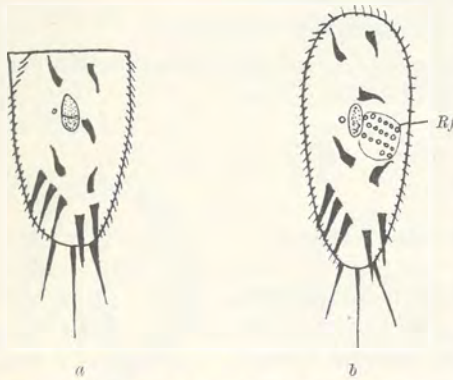


Abb. 2. Regeneration der hinteren Körperhälfte.
Rf das Regenerationsfeld.

neugebildeten Cirren. Aus Abbild. 3d ist ersichtlich, in welcher Ordnung die Cirrenanlagen verschoben werden, um ihre definitive Stellung einzunehmen. Nach beendigter Regeneration behalten die Cirren ihre beiläufige Anordnung in sechs ziemlich unregelmäßigen Längsreihen (Abb. 3d, die punktierten Linien I—VI), welche den Spalten des Feldes entsprechen.

Im hinteren Schnittstück, dessen Regenerationsverlauf soeben geschildert wurde, entsteht das Regenerationsfeld in der

Umgebung von Cirren 9 und 11 des Muttertieres. Von den 18 Cirrenanlagen des Feldes begeben sich acht (1, 2, 3, 5, 6, 8, 15 und 16) nach vorn, wo unterdessen eine endgültige Regulation der äußeren Gestalt des Infusors stattgefunden hatte, und sie bilden die acht definitiven Frontalcirren, indem sie ihre normale Stellung einnehmen. Die restlichen zehn Anlagen des Feldes begeben sich nach rückwärts. Zu derselben Zeit wird das hintere Körperende, welches die fünf Analcirren (4, 7, 10, 14, 18), die drei Kaudalborsten sowie einige Randcirren auf jeder Seite enthält, von dem übrigen Körper abgeschnürt. Dennoch bleibt dasselbe mit dem Gesamtkörper in dauernder Verbindung, wobei es nach und nach eingezogen und resorbiert wird. Selbst wenn das gesamte Kaudalende des Infusors samt den Analcirren vollständig neugebildet worden ist, bleibt das abgeschnürte Stück als eine kleine, etwas nach links verschobene Warze sichtbar (Abb. 3c). *Ishikawa* er-

wähnt in seiner Regenerationsarbeit die ältere Beobachtung von *Pro-wazek*, nach welcher beim hinteren Schnittstück eine „Hypertrophie“ in Gestalt einer Schwimmmembran zustande kommt. Wahrscheinlich handelte es sich eben um dieses allmählich verschwindende abge-schnürte Körperende.

Sobald die neugebildeten Analcirren das hintere Körperende er-reichen, können sie sofort ihren definitiven Platz einnehmen, ohne seitens der Cirren des mütterlichen Organismus behindert zu sein. Wie aus Abb. 3c ersichtlich, ist einige Zeit die Bewimperung des Kaudalendes eine doppelte. Es muß hervorgehoben werden, daß nach *Wallengren* bei normaler Teilung in einer ganz entsprechenden Weise

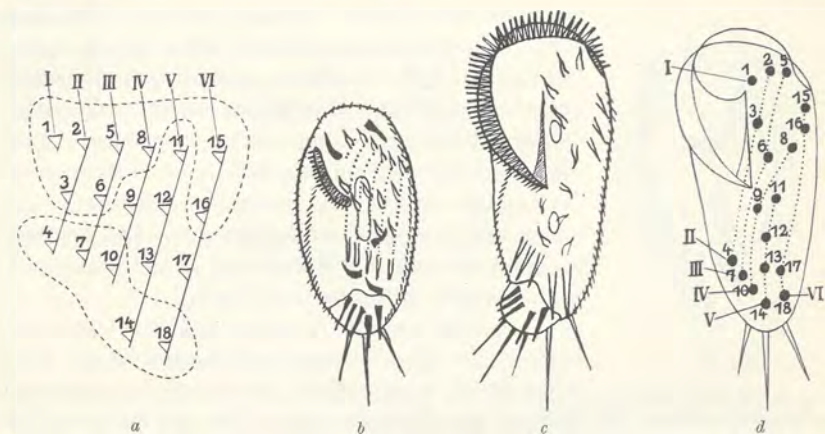


Abb. 3. *a* Schema des Regenerationsfeldes. Die geschlossenen punktierten Linien umfassen die acht zukünftigen Frontal- und die fünf Analcirren, die restlichen fünf Anlagen entsprechen den Bauchcirren. *b* Die Anlagen des Feldes werden auseinandergeschoben. Das hintere Körperende samt den fünf Analcirren wird abgeschnürt. *c* Ein späteres Stadium: die doppelte Bewimperung des Caudalendes. *d* Anordnung definitiver Cirren in sechs Längsreihen. Die Muttercirren sind schwarz, die neuentstandenen weiß.

eine Resorption eines Teiles des Protoplasmas des Hintertieres samt seinen Analcirren stattfindet. Wenn die neuentstandenen Analcirren nach rückwärts wandern und die Ansatzstellen der mütterlichen Bauchcirren (9, 11, 12, 13 und 17) passieren, beginnen diese letzteren zu verschwinden. An ihre Stelle treten dann die entsprechenden Cirren des Regenerationsfeldes. *Wallengren* glaubt den Anstoß zur Resorption der alten Cirren in der Annäherung der neuentstandenen zu deren Basis finden zu können. Während der Resorption eines Cirrus wird zunächst dessen Basis eingezogen, indem sie mit dem Körperplasma zusammenfließt, die Spitze dagegen bleibt noch eine längere Zeit beweglich. Schließlich ist noch von dem Cirrus nur eine kurze, scharfe Spitze zu sehen, die ebenfalls mit Protoplasma verschmilzt. Manch-

mal, wenn auch selten, tritt, wie das ebenfalls *Wallengren* angibt, ein körniger Zerfall des Cirrus, von dessen Spitze angefangen, ein.

Gleichzeitig mit der Veränderung des ventralen Wimperkleides kommt eine analoge Reorganisation der *Randcirren* zustande. Die neuen *Randcirren* entstehen im Bereiche zweier kleiner länglicher Felder, von welchen jedes eine Spalte in der Pellicula in der Nähe des vorderen Körperendes und der betreffenden Reihe von *Randcirren* parallel darstellt. Die Spalte der rechten Seite liegt rechts und nach außen von der alten Reihe, die linksseitige Spalte dagegen rechts und nach innen von der entsprechenden Reihe der Muttercirren (Abb. 4). Längs jeder Spalte sitzen sehr dicht die neuentstandenen Cirren auf. Beide Spalten verlängern sich den betreffenden Körperseiten parallel, und die

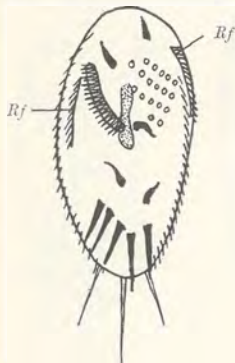


Abb. 4. Regeneration der hinteren Körperhälfte. *Rf* die beiden Spalten, in welchen die neuen *Randcirren* entstehen. Dazwischen das Regenerationsfeld.

in ihnen enthaltenen Anlagen werden allmählich auseinandergeschoben. In dem Maße als die neuen *Randcirren* sich vergrößern, unterliegen die alten einer allmählichen Resorption, aber noch einige Zeitlang sieht man längs jeder Körperseite eine doppelte Cirrenreihe (Abb. 3b). Die Verlängerung der Spalten, wie auch die Resorption der *Randcirren* treten von vorn nach rückwärts ein. Die Spalten, in deren Grunde die *Randcirren* zuerst erschienen sind, werden spurlos verschlossen.

Ungefähr nach 3 Stunden seit der Operation beginnt die Kernteilung des Schnittstückes. Dieselbe findet in derselben Weise wie bei normaler Teilung des Infusors statt. Der im Schnittstück zurückgebliebene einzelne Mikronukleus wird durchschnürt und in zwei Kerne, die im Körper des Stückes ihre in bezug auf die restituierte allgemeine

Form normale Stellung einnehmen, geteilt. Zugleich verlängert sich der Makronukleus, und derselbe teilt sich in zwei Kerne, so daß in kurzer Zeit der gesamte Kernapparat des Infusors zur Norm zurückkehrt. Annähernd gleichzeitig mit dem Beginn dieser Teilung, wenn die Verlängerung des Makronukleus soeben sichtbar geworden ist, entsteht links von demselben die Anlage des Peristoms (Abb. 4) in Gestalt einer Falte — der zukünftigen Adoralzone. Dieselbe enthält dicht beieinander gelegene Membranellen, deren weitere Entwicklung in allmählicher Auseinanderschiebung in der Richtung nach vorn sowie im gleichzeitigen Erlangen der definitiven Gestalt besteht. Bald gelangt eine analoge Entstehung der zweiten Falte, der sogenannten undulierenden Membran, zur Beobachtung, und später werden auf dieselbe Weise die mit feinen Cilien bewachsene präorale Membran wie auch endorale Membranen mit den zugehörigen Cilien gebildet. Alle

Wimpern des Peristoms entstehen ungefähr in demselben Körperpunkte im Bereiche des Kernes, und alle sie werden in der Richtung nach vorn auseinandergeschoben. Die Verhältnisse im Peristom bereiten dem Beobachter recht beträchtliche Schwierigkeiten, was mit der extremen Kleinheit der Gebilde zusammenhängt. Aus diesem Grunde bin ich leider nicht in der Lage eine genaue Schilderung der Peristombildung zu geben. Nach 5—7 Stunden kommt der gesamte Reorganisationsprozeß zum Abschluß. Beobachtungen dieser Art habe ich an einigen 40 Individuen ausgeführt, und immer war der Verlauf des Prozesses genau derselbe geblieben.

Die Reorganisation im *vorderen Schnittstück* (Abb. 5) unterliegt wesentlich denselben Regeln. Ganz ähnlich entsteht hier rechts vom Kerne ein Regenerationsfeld, welches 18 in sechs Reihen angeordnete Cirrenanlagen erzeugt. Die Anordnung der letzteren entspricht genau dem vorher Gesagten. Der einzige Unterschied besteht darin, daß hier andere Cirri, und zwar die frontalen (1, 2, 3, 5, 6, 8, 15, 16) der Resorption anheimfallen und durch neue ersetzt werden müssen. Was die Bauch- sowie Analcirren anbelangt, so nehmen sie sofort ihre normale Stellung ein. In diesem Falle findet auch keine Resorption des kaudalen Körperendes statt. Auf eine dem früher mitgeteilten entsprechende Weise erfolgt die Reorganisation der Randcirren, die Kernteilung, die Entstehung der Kaudalborsten usw. Die Dauer des Prozesses entspricht ebenfalls den schon für das hintere Stück erwähnten Verhältnissen.



Abb. 5. Regeneration der vorderen Körperhälfte. Es ist die dichte Anordnung der Wimpern im Grunde des Peristoms zu beachten.

Das Verhalten des Peristoms weicht jedoch von diesem Schema ab. Dessen Organellen müssen in diesem Falle *ersetzt* werden, und dies kommt auf die Weise zustande, daß die mütterlichen Membranellen und Cirren allmählich verschwinden in dem Maße, als das Wachstum und das Auseinanderschoben der neuentstandenen Teile vor sich geht, so daß niemals eine Lücke in den Membranellen entsteht. Vielmehr bleibt jede Membranelle stets ein lückenloses, funktionierendes Ganzes, welches einige Zeit sich teils aus den ursprünglichen, teils aber aus neugebildeten Elementen zusammensetzt (Abb. 5). Die Anlage des neuen Peristoms entsteht an tiefster Stelle des alten. Die Reihenfolge der Bildung neuer Peristomteile sowie deren Entwicklungsverlauf entsprechen den betreffenden Prozessen im hinteren Schnittstück.

Wie aus dieser Beschreibung erhellt, verläuft die Regeneration in genau derselben Weise, wie der bei normaler Teilung des Infusors statt-

findende Vorgang der Reorganisation. Die Identität beider Prozesse ist eine vollständige.

2. Querschnitt unterhalb beider Kerne (Abb. 6a).

Das vordere Schnittstück enthielt: acht Frontal- und drei Bauchcirren sowie die beiden Kerne, das hintere: zwei Bauch- und fünf Analcirren, ferner die drei Kaudalborsten und einen Teil der Randcirren. Der Körperpunkt, in welchem bei normaler Teilung das helle Feld entsteht, blieb unversehrt.

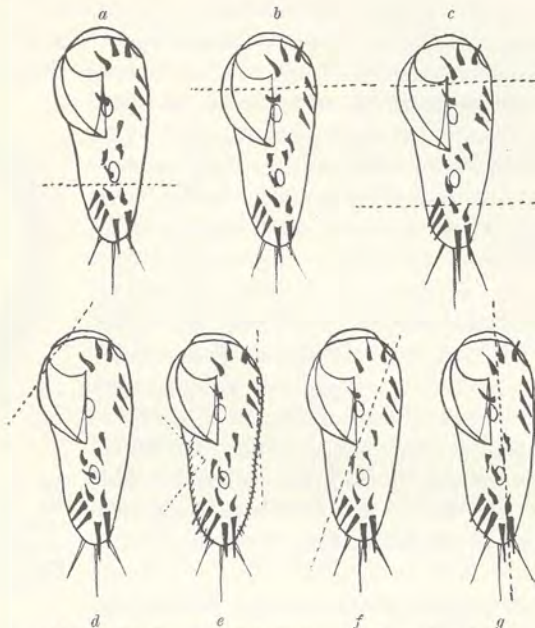


Abb. 6. Die Lage der Schnittebene in Versuchen 2-10.

Im vorderen Schnittstück wird ein Regenerationsfeld gebildet, und zwar in der Nähe und etwas rechts vom Vorderkern, also genau in demjenigen Punkt des Körpers, wo dasselbe auch bei der Teilung entsteht. *Das hintere Feld wird niemals gebildet, vorausgesetzt, daß die beiden Kerne im Schnittstück zurückgeblieben sind.* Übrigens war der Regenerationsverlauf in allen Einzelheiten der nämliche wie im Vorderstück des Versuches 1. Also erzeugte das vordere Regenerationsfeld die 18 Cirren, und wie gewöhnlich wurden acht von denselben zum Ersetzen der acht alten Frontalcirren verwendet. Nur müßten in diesem Falle auch die drei Bauchcirren (9, 11, 12) ersetzt werden. Die übrigen sieben Cirri des Feldes nehmen nach stattgehabter Regulation der äußeren Körpergestalt unmittelbar die ihnen entsprechenden Körper-

punkte ein. Die Randcirren entstehen in zwei Anlagen, von welchen eine die rechtsseitigen, die andere die linksseitigen Cirren ausbildet. Die Veränderungen des Kernapparates behalte ich einer späteren Mitteilung vor.

Die Operationen dieser Art wurden einige zwanzigmal ausgeführt, und zwar mit geringen Verschiebungen der Schnittlage, so daß das vordere Schnittstück zwei bis fünf Bauchcirren enthielt. Dies änderte aber nichts an Ergebnissen. Was das hintere Schnittstück anbelangt, so wird dessen Schicksal weiter unten, im Abschnitt über die kernlosen Stücke beschrieben.

3. Querschnitt oberhalb beider Kerne (Abb. 6b).

Das vordere Schnittstück enthielt höchstens vier Frontalcirren. Da im vorhergehenden Versuch das Entfernen des hinteren Körperendes die Entstehung des *vorderen* Regenerationsfeldes auslöste, habe ich erwartet, daß hier das hintere Feld zur Ausbildung gelangen wird. Jedoch entstand bei diesem Operationstypus, wie übrigens in allen anderen Versuchen, stets das *vordere* Feld in unmittelbarer Nähe des vorderen Kernes. Also unabhängig von der Art des Operierens erhält man immer dasselbe Regenerationsfeld. Im übrigen entsprach der Regenerationsverlauf des hinteren Stückes den schon früher beschriebenen Verhältnissen. Wie immer, wurden die Analcirren mit dem hinteren Körperende zusammen resorbiert. Die Dauer der Regeneration betrug 5–7 Stunden. Das vordere Schnittstück war kernlos, und somit gehört die Beschreibung seines Schicksals einem weiteren Abschnitte an.

4. Zwei Querschnitte oberhalb und unterhalb beider Kerne (Abb. 6c).

Das mittlere Schnittstück enthielt drei bis sieben Frontalcirren, drei bis fünf Bauch- und bis vier Analcirren sowie die beiden Kerne. Es kam zu einer typischen Regeneration mit Ausbildung des *vorderen* Regenerationsfeldes.

5. Entfernen eines Stückes Peristom ohne Cirren (Abb. 6d).

Trotzdem der gesamte Cirrenapparat unversehrt geblieben war und nur ein kleines Stück Peristom entfernt wurde, trat nicht nur eine Neubildung des ganzen Peristoms sowie die entsprechende Rückbildung des alten ein, sondern es fand auch eine *vollständige Reorganisation des gesamten Wimperkleides des Infusors statt*, wobei der Verlauf des Prozesses genau dem entsprach, was anlässlich früherer Experimente schon gesagt worden ist. Die Dauer der Regeneration betrug etwa 6 Stunden. Das Regenerationsfeld bildete sich in der Nähe des Vorderkernes. Die mehrmals wiederholte Operation zeitigte stets dasselbe Ergebnis. In einigen Fällen unterlag die Erneuerung einer Verspätung und trat erst nach 12–16 Stunden ein.

6. Entfernen von Randcirren, einseitig und beiderseitig (Abb. 6e).

Unabhängig von der Anzahl entfernter Randcirren trat eine typische Regeneration ein, und zwar wie stets, mit Ausbildung des vorderen Regenerationsfeldes und mit Neubildung des ganzen Cilienapparates, des Peristoms usw., obwohl sämtliche Körpercirren von der Operation verschont geblieben sind.

7. Entfernen von ein bis vier Analcirren.

Versuche dieser Art hatten den Zweck das Minimum der Verwundung festzustellen, welches die Regeneration des gesamten Wimperkleides des Infusors auslöst. Sämtliche Operationen wurden an Individuen gleichen Alters vorgenommen. Wurden vier Cirri amputiert (4, 7, 10, 14), so fand nach 6 Stunden eine vollständige Reorganisation des Wimperkleides sowie des Peristoms statt. Entfernen dreier Cirren hatte die gleiche Reorganisation, aber erst nach 9 Stunden zur Folge, wobei das Ergebnis davon unabhängig bleibt, in welcher Kombination die Cirren abgeschnitten werden. Nach Amputation zweier Cirren kam die Reorganisation nach 12 Stunden zustande. Schließlich führte die Amputation nur eines einzigen Cirrus mit einem Stück des hinteren Körperendes und den drei Kaudalborsten ebenfalls zur vollständigen Reorganisation, jedoch erst nach 16 Stunden. Ich versuchte auch *nur einen* Frontal- oder Bauchcirrus mit möglichst geringer Menge Protoplasma abzuschneiden. In allen Fällen führte die Operation zur Bildung des *vorderen Regenerationsfeldes* sowie zur gänzlichen Umbildung des Wimperkleides. Die Dauer der Reorganisation in den angeführten Versuchen war ziemlich schwankend, manchmal selbst nach 20 Stunden war keine Spur des Regenerationsfeldes zu bemerken. Früher oder später kam es doch immer schließlich zur Reorganisation. Dabei betrug die Dauer des eigentlichen Reorganisationsprozesses 5—7 Stunden. Im ganzen kann gesagt werden, daß die Regeneration *um so früher einsetzt*, je größer die Verwundung ist.

8. Amputation einer oder mehrerer Kaudalborsten.

Diese Operation bewirkte keinerlei Veränderung. Das Infusor, welches keine Nahrung erhalten hatte, bewegte sich mit den zurückgebliebenen Borsten bis zu seinem Tode. Wurde ihm Nahrung gegeben, so trat nach einiger Zeit die Teilung ein, nach welcher die gewöhnliche Reorganisation zur Beobachtung gelang.

9. Durchtrennung in einer schiefen Richtung (Abb. 6f).

Die Schnittfläche verlief schief zwischen den beiden Kernen. Das rechte Schnittstück enthielt vier Frontal- sowie sämtliche Bauch- und Analcirren, das linke Schnittstück führte das Peristom und die restlichen vier Frontalcirren. In allen Fällen regenerierten die beiden

Stücke, wobei in jedem ein dem zurückgebliebenen vorderen bzw. hinteren Kern entsprechendes Regenerationsfeld entstand.

10. Seitlicher Längsschnitt (Abb. 6g).

Das linke Schnittstück enthielt die beiden Kerne. Nach 7 Stunden beendete das Stück den ganzen Reorganisationsprozeß. Das rechte Stück verhielt sich wie überhaupt alle kernlosen Stücke. In einem solchen Falle verlief die Schnittebene rechts in unmittelbarer Nähe der beiden Kerne. Die Kerne rückten bald von dem Schnitttrande nach dem Mittelpunkt des Stückes und es kam ein übliches Regenerationsfeld zur Bildung. In diesem Falle wurde derjenige Punkt des Plasmas, in welchem normalerweise das Regenerationsfeld entsteht, entfernt. Das Feld erlitt eine Verschiebung nach links, und zwar folgte dasselbe dem Vorderkerne nach. Es läßt sich daraus schließen, daß die Anlage des Regenerationsfeldes nicht fest lokalisiert ist, sondern sie entwickelt sich in Abhängigkeit von dem Kerne.

II. Operation während der Teilung oder etwas später.

11. Querschnitt durch die Mitte des Vorderindividuums während der Teilung (Abb. 7a).

Nach einiger Zeit, je nachdem in welchem Stadium der Teilung die Operation ausgeführt wurde, kommt die bereits begonnene Teilung zu Ende, wobei der Vorgang genau in derselben Weise verläuft, als ob er von der Operation gar nicht beeinflusst wäre. Das hintere Individuum *B* verhält sich wie ein normales Tier und beendet seine noch vor der Operation begonnene Reorganisation nach 2 Stunden. Das von demselben abgetrennte Stück *A*₂ unterliegt ebenfalls einer Reorganisation, deren Verlauf dem analogen Prozesse im Stücke *A*₁ durchaus entspricht. Die Dauer der Reorganisation beider Stücke *A*₁ und *A*₂ ist genau dieselbe, wenn auch das Stück *A*₂ einige Zeit mit dem Stücke *B* im Zusammenhange bleibt. Dieser Umstand erlaubt den Schluß, daß die Teilungseinschnürung des Protoplasmas, selbst wenn dieselbe noch ganz schwach ausgesprochen ist, zwei sich autonom entwickelnde Einheiten voneinander trennt. Auch in dem Falle, wenn der Schnitt unterhalb des Hinterkernes liegt (Abb. 7b), wenn also im Zusammenhange mit *B* nur ein schmaler Protoplaststreifen des Individuums *A*₂ verbleibt, wird dieser Streifen in keinem Falle resorbiert. Vielmehr kommt die normale Durchschnürung des Protoplasmas zustande, und das kleine Stück *A*₂ verhält sich wie überhaupt ein kernloses Schnittstück.

Die der Abb. 7a entsprechende Operation (der Schnitt ging etwas weiter rückwärts) wurde auch noch im Beginn der Teilung, als im ursprünglichen Individuum zwei Cirrenfelder (von welchen das vordere

dem Regenerationsfelde homolog ist) entstehen, ausgeführt. Die im vorderen Felde gebildeten Cirri hatten eben ihre Wanderung zu den Basen der Muttercirren begonnen. Auf diese Weise enthielt das Stück A_1 die noch unveränderten Cirri des ursprünglichen Individuums (1, 2, 3, 5, 15, 16) sowie die soeben entstandenen, noch kaum sichtbaren Cirri des Feldes (1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 15, 16). Die einen wie die anderen unterliegen nach der Operation einer Rückbildung, trotzdem die neuentstandenen Cirren ihre volle Entwicklung noch nicht erreicht hatten. Im übrigen unterliegen die Stücke A_1 und A_2 einer typischen Reorganisation.

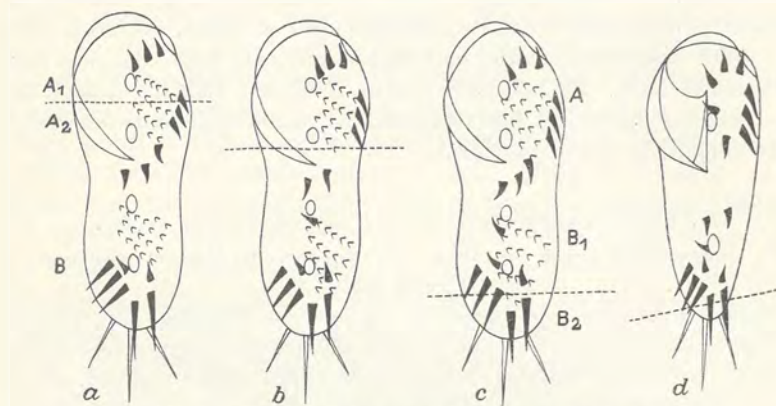


Abb. 7. Die Lage der Schnittebene in Versuchen 11 und 12.

12. Amputation des Hinterendes des hinteren Individuums während der Teilung (Abb. 7c).

Der Schnitt trennte die Cirren 10, 14, 18 sowie die drei Kaudalborsten von dem übrigen Körper des Hinterindividuums ab, wobei ein Teil der bei der Teilung neugebildeten Cirren verletzt wurde. Sämtliche Kerne blieben intakt. Wie im vorigen Versuch, trennte sich das Vorderindividuum auf gewöhnliche Weise von dem verletzten hinteren. Das Stück B_1 erlitt die gewöhnliche Regeneration mit Rückbildung der bei der Teilung entstandenen doppelten Bewimperung. Also in beiden Fällen, d. h. in Versuchen 11 und 12, wird die einmal begonnene Teilung zu Ende geführt, unabhängig davon, ob eine Operation ausgeführt wurde oder aber das Tier intakt geblieben war.

Ich habe auch sich in verschiedenen Stadien der Teilung befindende Individuen verwendet, selbst in frühesten Stadien, wo die beginnende Teilung nur dadurch zu erkennen ist, daß der mittlere Körperteil des Infusors sich etwas verlängert und der Hinterkern samt den Bauchcirren nach rückwärts verschoben werden (Abb. 7d). Wurde das Tier in diesem letzteren Stadium operiert, so kam zunächst die Teilung des

Infusors zustande, und es fanden im intakten, gegebenenfalls vorderen Individuum *A* keine weiteren Veränderungen statt. Also, sobald die allerersten Anzeichen der beginnenden Teilung soeben sichtbar geworden sind, verhält sich das Infusor der Operation gegenüber vollkommen verschieden. Statt ein einheitliches Regenerationsfeld auszubilden und die Reorganisation anzutreten, führt es die begonnene Teilung ungestört zu Ende. Wird die Operation etwas später vorgenommen und werden dabei die im Cirrenfelde während der Teilung neuentstandenen Cirren verletzt, so tritt das operierte hintere Individuum, nachdem die gewöhnliche Teilungsreorganisation zu Ende geführt wurde, sofort die Regeneration ein. Werden dagegen nur solche Teile des ursprünglichen Individuums entfernt, die *ohnehin einer Rückbildung anheimfallen müßten*, so genügt die normale Teilungsreorganisation, um das Ganze wiederherzustellen und die Vorgänge der Regeneration treten gar nicht auf.

Ich beabsichtigte die Versuche *Hartmanns*, welcher gezeigt hatte, daß die Entfernung eines Körperteiles bei *Stentor* die Teilung aufhält, auch an *Stylonychia* zu wiederholen. Jedoch, wie aus dem Versuche 12 ersichtlich, ließ sich hier die Teilung auf diese Weise nicht rückgängig machen.

13. Querschnitt durch das Individuum nach seiner Teilung (Abb. 8).

Die bei normaler Teilung eintretende Reorganisation des Wimperkleides kommt noch nicht zu Ende, als die beiden Individuen *A* und *B* sich voneinander trennen. In jedem von denselben sind neben den in Rückbildung begriffenen mütterlichen Organellen die neuentstandenen zu sehen. Ein solches Tier, das noch an vielen Stellen eine doppelte Bewimperung hatte, schnitt ich quer durch. Immer nach der Operation kam es zuerst zur Rückbildung alter Cirren, also es wurden die mit normaler Teilung verbundenen Prozesse zu Ende geführt, und erst nachher begann die nochmalige Reorganisation des ganzen Infusors mit typischer Bildung des Regenerationsfeldes.

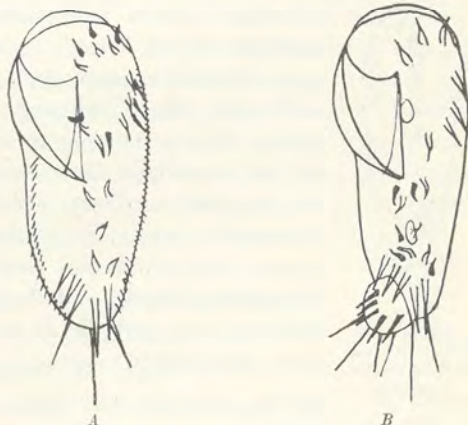


Abb. 8. *A* das vordere, *B* das hintere Individuum, erhalten durch einen Querschnitt während der Teilung. Die mütterlichen Cirren sind schwarz.

14. Amputation des nach der Teilung oder Regeneration zurückgebliebenen Hinterkörperrestes (Abb. 9).

Ich schnitt die die mütterlichen Analcirren enthaltende plasmatische Warze ab. Wurde das junge Individuum dabei nicht verletzt, so kam keinerlei Veränderung zum Vorschein. Der Plasmarest der Warze wurde durch das Plasma des jungen Organismus resorbiert, und die entstandene Narbe verheilte ohne jede Spur. Es genügte jedoch, *nur einen soeben erneuten Analcirrus* zu verletzen, um eine vollständige Reorganisation des gesamten Wimperkleides hervorzurufen.



Abb. 9. Amputation der einer Resorption unterliegenden plasmatischen Warze.

III. Verletzen ohne Entfernen irgendwelcher Teile des Organismus.

15. Unvollständige Durchtrennung des Infusors.

Bei den Operationen dieses Typus versuchte ich auf den Organismus mit demselben Reiz einzuwirken, welcher vermutlich die gewöhnliche Regeneration auslöst, wobei jedoch das Ganze des Organismus intakt geblieben war. Das Infusor wurde mit der Schneide des Messers eingedrückt, und zwar wurden dabei die Pellucula der dorsalen Körperseite sowie das Ekto- und Endoplasma durchschnitten, jedoch blieben die beiden Schnittstücke vermittelt der Bauchpellicula bzw. der Dorsalpellicula, wenn der Einschnitt von der Bauchseite erfolgte, verbunden. Die Richtung des Schnittes war verschieden. Schon bald nach der ausgeführten Operation schließt sich die Wunde und der Eingriff zieht keine weiteren Veränderungen nach sich. Es folgt daraus m. E., daß nicht die Verletzung selbst den Regenerationsreiz bildet, da die Reizung in diesem Falle kaum geringer ist als bei sonstigen Operationen. Es muß hervorgehoben werden, daß in diesen Versuchen einige Individuen doch regeneriert hatten. Es scheint mir jedoch, daß die Regeneration stets durch eine Beschädigung der Randcirren hervorgerufen wurde. Jedenfalls zeigte die überwiegende Mehrzahl der auf die Weise operierten Infusorien keine Spur der Regeneration.



Abb. 10. Anschneiden des hinteren Körperendes.

16. Anschneiden des hinteren Körperendes.

Aus verschiedenen Varianten des Versuches verdient einer besondere Beachtung. Der Schnitt ging schief und trennte zwei Analcirren sowie die drei Kaudalborsten mit einem Teil des Plasmas von dem übrigen Organismus. Das hintere Schnittstück blieb aber vermittelt einer schmalen plasmatischen Brücke mit dem Ganzen des Körpers in

Verbindung. Obwohl ich die betreffenden Individuen (Abb. 10) längere Zeit beobachtete, selbst nach 24 Stunden konnte ich keinerlei Reorganisationsprozesse bemerken. Es kommt nur eine unbedeutende Abrundung der Wundränder zustande. Diese Operation führte ich mehrmals aus. Dennoch nicht immer blieb das Ergebnis dasselbe. Wie im vorigen Versuche hängt das wahrscheinlich mit einer zufälligen Beschädigung der Randcirren zusammen. Meistens trat die Regeneration nicht ein: das Infusor, das keine Nahrung erhielt, bewegte sich mit seinem Anhängsel bis zu seinem Tode. Wird ein solches Infusor gefüttert, so tritt die Teilung ein, wobei natürlich die gewöhnliche Reorganisation stattfindet. In einigen Fällen warf das sich energisch bewegende Infusor das hintere Anhängsel ab, wobei bald der typische Regenerationsprozeß einsetzte. Ähnlicherweise konnte die Regeneration durch Abschneiden nur eines am hinteren Anhängsel sich befindenden Cirrus hervorgerufen werden. Wie schon in vorigen Versuchen hervor gehoben, genügt es, nur einen Cirrus abzuschneiden, um eine vollständige Reorganisation des ganzen Organismus auszulösen. In unserem Falle wurden zwei Cirri und ein Teil des Plasmas abgetrennt, und doch fanden im Körper des Infusors keine wichtigeren Veränderungen statt. Also nochmals nicht die Verletzung selbst, sondern vielmehr die Entfernung gewisser Teile des Organismus stellt den Regenerationsreiz dar.

17. Entfernen von Plasmastücken ohne Cirri.

Die Infusorien habe ich in verschiedenen Körperpunkten mit Hilfe eines Kapillarrohres angestochen. Am Orte der Verletzung entstand ein rundes Loch mit ebenen Rändern. Ich beabsichtigte anfangs auf diese Weise den Kern zu entfernen, aus technischen Gründen gelang mir aber diese Operation nicht. Nach Entfernen von Plasmateilen schloß sich die Wunde ziemlich langsam. Nach etwa einer halben Stunde pflegte aber sie spurlos zu verschwinden. Die Operation rief keine Regenerationserscheinungen hervor. Wird, wie auch im Versuche 7, bei dieser Operation mit dem Plasma auch nur ein Cirrus entfernt, so zieht das notwendigerweise die Reorganisation sämtlicher Körperteile nach sich.

IV. Das Verhalten kernloser Schnittstücke.

18. Die in verschiedenen Versuchen enthaltenen, also von verschiedenen Körperteilen stammenden kernlosen Stücke, die eine sehr verschiedene Plasmamenge mit sehr schwankender Anzahl von Cirren, Cilien und Borsten enthielten, verhielten sich stets auf ähnliche Weise. In allen Fällen kam eine gewisse Regulation der äußeren Körpergestalt zustande. Diese Regulation bestand aber nur im Zusammenziehen der Wundränder sowie in einer Abrundung des Stückes (Abb. 11). Wenn das Schnittstück eine größere Anzahl von Cirren und Cilien enthielt

so machte es bei oberflächlicher Betrachtung den Eindruck eines normalen Tieres. Wenn das Schnittstück von einem Individuum stammte, welches soeben seine Teilung durchgeführt hatte und eine doppelte Bewimperung enthielt, könnte es sogar die normale Anzahl von 18 Cirren aufweisen. Wir haben jedoch gesehen, daß die eigentliche Regeneration immer mit Entstehung eines Regenerationsfeldes, welches seinerseits in Abhängigkeit von dem Kerne steht, zusammenhängt. Im Versuche 10 bewirkte die Veränderung der Lage des Vorderkernes eine entsprechende Verschiebung der Lage des Regenerationsfeldes. Aus diesen Gründen könnte die Regeneration kernloser Stücke nicht erwartet werden. Tatsächlich vermochte ich niemals irgendwelche Veränderungen des Cirrenapparates zu bemerken. Die Anzahl der Cirren, welche das Schnittstück von dem mütterlichen Organismus erhalten hatte, blieb stets dieselbe. Beobachtungen dieses Typus waren die

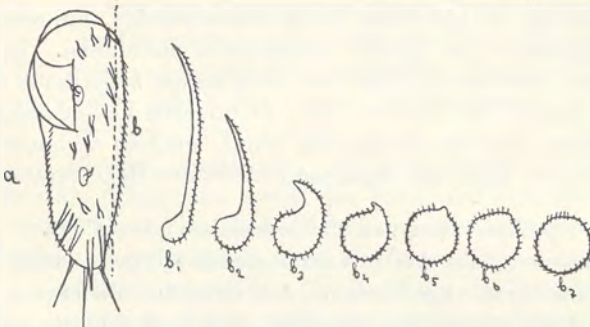


Abb. 11. Regulation der äußeren Form eines kernlosen Stückes.

zahlreichsten. Es ist möglich, daß in den Fällen, wo das kernlose Schnittstück von dem Individuum stammte, in welchem im Momente der Operation der Resorptionsvorgang stattfand, diese Resorption nicht sofort nach der Operation zum Stillstand kam. Ich vermochte das mit vollkommener Sicherheit nicht festzustellen, es ist aber zweifellos, daß diese Resorption, wenn sie noch überhaupt vor sich geht, sehr bald eingestellt wird.

Das Ergebnis dieser Versuche stimmt sehr gut damit überein, was wir überhaupt über die Rolle des Kernes bei der Protozoenregeneration wissen. Es widerspricht jedoch auf das Entschiedenste den Resultaten von *Ishikawa*. Dieser Autor fand, daß auch in sehr geringen kernlosen Schnittstücken von *Stylonychia* ein Regenerationsprozeß vor sich geht, wobei bemerkt wird, daß solche Schnittstücke bald zugrunde gingen. *Ishikawa* erwähnt nicht einmal die Reorganisation des Körpers und die Entstehung des Regenerationsfeldes, er begnügt sich vielmehr mit der Angabe, daß die äußere Körperform reguliert wird, und

daß in einigen Fällen die Cirren neugebildet werden, was ich niemals in kernlosen Stücken gesehen habe. So meint z. B. *Ishikawa*, daß ein kernloses Stück, wie etwa das Stück B_2 auf meiner Abb. 7c regeneriert und bildet sogar die neugebildete Bewimperung dieses Stückes ab. Er ist geneigt den Vorgang durch den Einfluß der Kerne des ganzen Individuums, mit welchem das Stück in Zusammenhang blieb, zu erklären. Dem widersprechen meine Beobachtungen, worauf ich noch später zu sprechen komme. Wie wir im nächsten Versuche sehen werden, lassen sich durch wiederholte Operation solche vollkommen regenerierte Stücke erhalten, die unvergleichlich kleiner sind als die von *Ishikawa* erwähnten kernlosen Stücke. Die Stücke müssen jedoch unbedingt einen Kern enthalten. Solche Stücke bleiben auch längere Zeit am Leben. Das Absterben der von *Ishikawa* beobachteten Schnittstücke spricht sehr deutlich dafür, daß es sich hier gar nicht um eine echte Regeneration handelte. Auch ich habe gesehen, daß die kernlosen Stücke, mögen sie selbst eine beträchtliche Größe haben, schon nach einer kurzen Zeit zugrunde gehen, wie das auch *Ishikawa* angibt.

V. Wiederholte Regeneration.

19. Ich beabsichtigte, die geringste Größe des Infusors festzustellen, welche noch zur Reorganisation fähig ist. Das Tier wurde quer zwischen den beiden Kernen durchschnitten. Die beiden erhaltenen Schnitthälften wurden in einzelne Gefäße gesetzt und nach beendigter Reorganisation auf dieselbe Weise wiederum operiert. Sobald die Regeneration von allen vier Individuen, von welchen jedes einem Viertel des ursprünglichen Infusors entsprach, zu Ende gekommen ist, wurden sie nochmals demselben Eingriff unterzogen. Auf ähnliche Weise verfuhr ich weiter. Während der ganzen Beobachtungszeit, wobei natürlich nicht alle Schnittstücke gezüchtet wurden, da ihre Zahl zu stark wäre, erhielten die Infusorien keine Nahrung. In einigen Fällen wiederholte ich eine solche Operation zehnmal nacheinander, und ich erhielt vollkommen normal organisierte *Stylonychien*, deren Länge aber mehr als 32 mal geringer war, als die Länge des ursprünglichen Tieres. Es ist von Interesse, daß unabhängig von der Größe des regenerierenden Infusors, die Dauer des Regenerationsprozesses nur in sehr engen Grenzen schwankte. Die nach zehn Operationen erzeugten Infusorien waren kleiner als *Colpidien*, die ja sonst zur Fütterung meiner *Stylonychia*-Kulturen zur Verwendung kamen. Die kleinsten der von mir erhaltenen *Stylonychien* besaßen das Plasma mit schwarzen Körnchen gefüllt, was ein Zeichen der beginnenden Degeneration bilden dürfte. Noch weitere Beschädigung des Infusors kam bei meinen technischen Mitteln einer Zerquetschung des Tieres gleich.

Ein ähnliches Ergebnis erhielt ich bei unbedeutender Modifikation

des Versuches. Die ursprüngliche *Stylonychia* schnitt ich quer, etwas unterhalb des Hinterkernes durch, auf welche Weise das regenerierende Stück stets zwei Kerne enthielt. Nach erfolgter Regeneration führte ich wiederum, wie vorher, die nämliche Operation aus. Da in diesen Fällen etwas mehr als die Hälfte des Infusors geblieben war, könnten die Operationen etwas weiter geführt werden. Nach 50–60 solchen Operationen erhielt ich Infusorien, die ganz ähnlich den soeben beschriebenen aussahen.

Die Kerne eines eine wiederholte Regeneration ausführenden Infusors behalten immer ihre proportionelle Größe, d. h. sie sind absolut viel kleiner als die Kerne eines normalen Tieres. Daraus muß gefolgert werden, daß in meinen Versuchen eine tiefgreifende Reorganisation des gesamten Kernapparates stattgefunden hatte, worüber ich in einer späteren Arbeit, welche speziell den Kernverhältnissen der regenerierenden *Stylonychien* gewidmet sein soll, berichten werde.

Diskussion.

Die mitgeteilten Untersuchungen gestatten einige Schlüsse allgemeinerer Natur.

Aus der Zusammenstellung der soeben beschriebenen Versuche folgt, daß die Regeneration des ganzen Cilienapparates von *Stylonychia* ausschließlich im Zusammenhange mit Entstehung eines Regenerationsfeldes sowie einer Erneuerung sämtlicher Cilien und Cirren zustande kommt. In keinem Falle utiliziert ein Schnittstück seine ursprünglichen Strukturen, vielmehr bildet es dieselben neu. Selbst bei geringster Beschädigung, wie im Versuch 7, verläuft die Regeneration genau nach demselben Schema.

Besonders muß ich hervorheben, daß das Regenerationsfeld immer einzeln auftritt. Bei allen möglichen Beschädigungen des Körpers mit Erhaltung beider Kerne, wie in den Versuchen 2–7 und 10, entsteht das *vordere Feld*, in der Nähe des Vorderkernes. Das hintere Feld wird nur dann gebildet, wenn der vordere Kern entfernt worden ist (Versuch 1 und 9). Es läßt sich vermuten, daß der Zusammenhang zwischen dem Regenerationsfeld und dem betreffenden Kern nicht nur ein lokaler, sondern auch ein kausaler ist. Wie anlässlich des Versuches 10 angegeben, entspricht der durch die Operation bewirkten Wanderung des Kernes zum Mittelpunkt des Körpers eine ebensolche Verschiebung des Punktes, in welchem das Regenerationsfeld entsteht. Die Regeneration kernloser Schnittstücke ist unmöglich, da in Abwesenheit des Kernes kein Regenerationsfeld gebildet werden kann. Sollte ein solcher kausaler Zusammenhang tatsächlich bestehen, so würde das die weitere Vermutung aufdrängen, daß die Regenerationspotenzen beider *Stylonychia*-Kerne nicht einander gleich sind. Die Anwesenheit des Vorder-

kernes übt einen hemmenden Einfluß auf die Entwicklung des hinteren Regenerationsfeldes aus. Tatsächlich gewinnt das Protoplasma der hinteren Körperhälfte nach Entfernung des Vorderkernes ihre Fähigkeit, ein Regenerationsfeld auszubilden, wieder. Bei der Regeneration von Randcirren entsteht ein entsprechendes Cilienfeld in Gestalt einer Spalte von jeder Seite, immer in der *vorderen Körperhälfte* des Infusors, und die Entwicklung neuer Randcirren erfolgt *von vorn* nach rückwärts. Es folgt daraus, daß der vordere Körperteil der *Stylonychia*, oder genauer gesagt die Gegend des vorderen Kernes überhaupt den Sitz von intensiven metabolischen Prozessen bildet. Das stimmt sehr gut mit den Arbeiten von *Child* überein, welcher an sehr verschiedenen Objekten die Existenz einer allmählichen Differenz der Empfindlichkeit längs der physiologischen Achse des Organismus feststellen konnte. Diejenigen Körperteile, in welchen die metabolischen Prozesse intensiver sind, sind zugleich gegen verschiedene Beschädigungen weniger widerstandsfähig. *Paramaecium* und *Stentor* zeigen die größte Empfindlichkeit gegen $K_2Mn_2O_8$ im vorderen Körperteil, was durch eine allmähliche braune Ausfärbung des Körpers von vorn nach rückwärts, also allmähliche Reduktion des $K_2Mn_2O_8$ in MnO_2 bewiesen wird. Bei *Stylonychia* zeitigt KCN denselben Erfolg.

Der Regenerationsprozeß von *Stylonychia* scheint fest determiniert zu sein. So hat jeder Cirrus des Regenerationsfeldes sein ganz bestimmtes Schicksal, und selbst der Weg der Wanderung seiner Anlage läßt sich genau vorhersehen. Und doch beweist die wiederholte Regeneration (Versuch 19), bei welcher die ursprüngliche Substanz des Infusors zum mindesten auf 1000 Schnittstücke verteilt wurde, wobei jedes dieser Stücke sein eigenes vollständiges Regenerationsfeld sowie den ganzen Cilienapparat ausgebildet hatte, daß die Anlage des Regenerationsfeldes nur in bezug auf ein gewisses physiologisches Ganzes determiniert sein kann. Selbst das kleinste Schnittstück, insofern es einen Kern enthält, stellt ein solches physiologisches Ganzes dar. Von irgendwelchen festen prädestinierten Anlagen des Cilienapparates kann selbstverständlich nicht gesprochen werden. Die Determination der Entwicklung von Cilien oder Cirren existiert nur insofern, als der Reorganisationsvorgang immer auf dieselbe Weise verläuft.

In der Regenerationsliteratur wird schon seit langer Zeit die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Regeneration und Ontogenese erörtert. Viele Forscher sind der Meinung, daß der Regenerationsprozeß in derselben Weise und derselben Reihenfolge wie die ontogenetische Entwicklung des gegebenen Körperteiles vor sich geht. Es ist aber nicht daran zu zweifeln, daß in sehr vielen Fällen der Organismus kürzere und einfachere Mittel zur Rekonstruktion des Ganzen verwendet. Im Falle der *Stylonychia* entspricht der Verlauf der Regeneration des

Cilienapparates ziemlich genau denjenigen Prozessen, welche die gewöhnliche Teilung begleiten und die wir gewissermaßen als Ontogenese bezeichnen dürfen. In beiden Fällen kommt auf dieselbe Weise die Teilung des Kernes zustande, es entsteht das Regenerationsfeld, welches in beiden Fällen genau dieselben Cirri enthält, und das Schicksal dieser Cirri bleibt das nämliche. Auf eine durchaus analoge Weise erfolgt die Reduktion mütterlicher Cirren sowie des caudalen Körperendes, welches abgeschnürt und eingesogen wird, dann die Erneuerung des Peristoms, der Randcirren u. dgl. Alles dies geschieht sowohl bei der Ontogenese, wie auch der Regeneration auf genau dieselbe Art. Es gibt jedoch einige Unterschiede. Ich meine hier namentlich das einzelne Regenerationsfeld, welches dem doppelten Cirrenfelde bei normaler Teilung nicht entsprechen kann. Die früher beschriebenen Tatsachen erlauben diesen Unterschied gewissermaßen zu begreifen. In einer der Modifikationen des Versuches 11, wo nur ein schmales kernloses Stück des Vorderindividuums mit dem sich teilenden Infusor in Verbindung geblieben war, fiel dieses Stück nicht der Resorption anheim, sondern wurde durch die gewöhnliche Durchschnürung abgetrennt (Abb. 7b). Trotz der Operation verhielt sich das hintere Individuum vollkommen normal. Diese Erscheinung spricht dafür, daß die Teilung des Infusors in erster Linie eine physiologische ist. Noch bevor die Teilungsdurchschnürung erschienen ist, bilden schon die beiden Individuen zwei autonome Einheiten, zwischen denen der Stoffaustausch nur schwer zustande kommen kann. Im Versuch 11 rief die Entfernung eines kleinen Stückes des Vordertieres während der Teilung eine vollständige Reorganisation seines Cilienapparates hervor, wobei ein einzelnes Regenerationsfeld entstand, obwohl die normale Teilungsreorganisation im Momente der Operation noch nicht zu Ende gekommen war. Wenn auch die Operation in einem frühen Stadium der Teilung, wo die beiden Individuen miteinander noch fast auf der ganzen Körperbreite verbunden waren, ausgeführt wurde, ist das Hintertier davon gar nicht beeinflußt worden. Vielmehr trennte sich dasselbe mittelst einer gewöhnlichen Durchschnürung ab, und auf eine normale Weise führte es die noch vor der Operation begonnene Reorganisation zu Ende. Wurde einer Operation das hintere Individuum unterzogen, so machte dies auf das vordere Tier, welches sich verhielt, als ob die Operation überhaupt nicht ausgeführt worden wäre, gar keinen Eindruck. Stets kam die mit der Regeneration verbundene Erneuerung nur im operierten Individuum zustande. Das sich teilende Infusor verhält sich also wie zwei autonome Individuen, nicht aber wie ein einziges Ganzes.

Bei der analogen Erneuerung von Randcirren entstehen im vorderen Körperende zwei Spalten mit Anlagen der neuen Cirren. Dagegen

enthält bei der Teilung der vordere Körperteil *jedes* von den beiden neuentstehenden Individuen zwei solche Spalten, also es kommt noch ein hinteres Spaltenpaar zur Entwicklung. Hier sehen wir dieselben Verhältnisse. Da nach experimenteller Entfernung der vorderen Körperhälfte das hintere Schnittstück zwei Seitenspalten ausbildet, ebenso wie es das vordere Stück tut, folgt daraus, daß eine quere Durchschneidung einer *Stylonychia* denselben Erfolg als der Beginn einer Teilung zeitigt. Mit anderen Worten sind schon im Moment der Entstehung zweier Regenerationsfelder die beiden zukünftigen Individuen als unabhängige Einheiten zu betrachten, obwohl die Einschnürung noch gar nicht sichtbar ist.

Im Versuch 11 ruft die quere Durchschneidung eines sich teilenden Individuums genau in der Teilungsebene keinerlei Regenerationsprozesse hervor. Wird aber der Schnitt nur etwas ober- oder unterhalb dieser Ebene geführt, so erfolgt die Reorganisation des beschädigten Individuums. Die Teilungsebene bildet also eine Art Grenzzone, die andere Eigenschaften als das benachbarte Protoplasma besitzt. Dies bestätigt die eben ausgesprochene Vermutung, daß diese Zone möglicherweise den Stoffaustausch zwischen den beiden zukünftigen Individuen erschwert.

Und noch eine Beobachtung gestattet einen Schluß in derselben Richtung. Im Versuch 14 zog die Entfernung der plasmatischen Warze mit sämtlichen Analcirren keinerlei Regenerationsprozesse nach sich. Und doch führt die Entfernung nur eines Analcirrus, wie im Versuch 7, sicher zur Reorganisation. Die Ursache dieser Verschiedenheit des Verhaltens kann damit zusammenhängen, daß bei der Regeneration des hinteren Schnittstückes, ähnlich wie bei der Teilung, das hintere Körperende mit seinen Analcirren und Caudalborsten von dem restlichen Körper abgeschnürt wird. Das hintere Stück befindet sich also jenseits der Grenzzone, durch welche der Einfluß der Beschädigung nicht hindurchgehen kann. Im Versuch 16 dagegen, wo ein Stück des hinteren Körperendes mit zwei Analcirren mit dem Reste des Körpers vermittelt einer schmalen Protoplasmaabücke verbunden war, fehlte eine solche Grenzzone. Aus diesem Grunde hatte die Entfernung nur eines Cirrus des Anhängsels die Reorganisation des ganzen Infusors hervorgerufen. Der Unterschied zwischen Regeneration und Ontogenese bei *Stylonychia* hängt damit zusammen, daß während der Teilung die Gegend der zukünftigen Einschnürung andere Eigenschaften als das übrige Protoplasma annimmt und den Stoffaustausch verhindert bzw. erschwert. Prinzipiell jedoch, wie die tiefe Analogie beider Prozesse anzeigt, macht das Infusor sowie bei der Ontogenese, wie auch der Regeneration von denselben Fähigkeiten seines Organismus Gebrauch.

Viel umstritten wird die Frage nach dem Regenerationsreiz. Meine

Versuche entscheiden dieselbe nicht, sie erlauben jedoch einige Vermutungen allgemeiner Natur.

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten erörtert. Nach einigen Autoren bildet der Operationsreiz die eigentliche Ursache, welche das Regenerationsgeschehen auslöst. Im Versuch 15 waren die Infusorien nur angeschnitten, nicht aber zertrennt. Der hierbei ausgeübte Reiz war kaum geringer, als bei irgendeiner Operation, und doch führte er zu keiner Regeneration. Im Versuch 16 wurde ein Stück des hinteren Körperendes samt einigen Analcirren fast vollständig von dem übrigen Körper abgetrennt und wiederum fand dabei keine Regeneration statt. Die Durchtrennung der engen Plasmabrücke, welche das Stück mit der Hauptmasse des Körpers verband, ist dagegen im Verhältnis zur vorigen Operation als ein recht schwacher Reiz zu betrachten, und nichtsdestoweniger löste eben dieser schwache Reiz eine vollständige Reorganisation aus. Die während der Narkose operierten Infusorien waren ebenso zur Regeneration stimuliert als die nicht narkotisierten, obwohl der Reiz hier ein sehr geringer sein mußte. Also finde ich in meinen Versuchen keine Tatsachen, die zugunsten der traumatischen Reizung als des eigentlichen Regenerationsreizes sprechen würden.

Nach anderen Autoren ist die Störung des normalen Gleichgewichtes des Organismus als der wirksame Reiz zu betrachten. Meine eigenen Versuche sprechen möglicherweise eben für diese Ansicht. Das Entfernen eines kleinen Protoplaststückes ohne Kern und ohne Cirren zog keine Regenerationsprozesse nach sich. Dagegen hatte die Entfernung eines kleinen Peristomstückes die Reorganisation des ganzen Tieres hervorgerufen. Der Unterschied zwischen beiden Versuchen besteht darin, daß im zweiten Falle nicht nur Protoplasma, sondern auch einige Peristomcilien abgetrennt wurden. Ebenso im Versuch 7 war die Reorganisation durch Abtrennung nur eines Analcirrus fast ohne Protoplasma eingeleitet. Schließlich hatte die Amputation einer oder mehrerer Caudalborsten (Versuch 8) gar keinen Einfluß auf das Schicksal des Tieres. In diesem letzten Falle handelt es sich offenbar um einen nicht funktionierenden, jedenfalls unbeweglichen Körperteil, welcher durch keinen Stoffaustausch mit dem Organismus verbunden ist, und dessen Amputation durch das Infusor unmittelbar gar nicht perzipiert werden konnte. Auch das Ausschneiden eines Stückes undifferenzierten Plasmas blieb ohne Effekt. Ähnlich erklärt *Maas* den Mangel an Regeneration bei Spongien durch eine schwache Individualisation dieser Tiere, welche in allen Teilen ihres Körpers ungefähr dieselben Elemente enthalten. Es ist also möglich, daß ein aus einer *Stylonychia* ausgeschnittenes Plasmastück sofort durch benachbarte Plasmateile ersetzt werden kann, und eben deswegen führt seine Entfernung zu kei-

ner Regeneration. Es läßt sich vermuten, daß zwischen den lebenden funktionierenden Cilien und dem Protoplasma ein ständiger Stoffaustausch besteht, und die Abtrennung selbst nur eines einzigen Cirrus sofort das normale physiologische Gleichgewicht des ganzen Organismus verschiebt. Daß es sich dabei nicht nur um das morphologische Gleichgewicht handelt, dies beweisen die Ergebnisse der Versuche 8 und 16. Besonders dieser letztere kann m. E. nur in der Richtung gedeutet werden, daß irgendwelche Substanzen zwischen den Cirren und dem Körperprotoplasma zirkulieren und den Organismus in einem gewissen Zustand der „Ganzheit“ erhalten. Wird einer von diesen physiologischen Wegen durchtrennt, muß das einen Einfluß auf den ganzen Organismus ausüben und erst sobald eine vollständige Reorganisation stattgefunden hatte, kann dieser zur Norm zurückkehren.

Damit stehen die alten Beobachtungen von *Engelmann*, später durch *Maupas* bestätigt, im Einklang. Diese Forscher fanden, daß bei *Stylonychia* von der Ansatzstelle jedes Randcirrus sowie Analcirrus zum Vorderkerne hin feine plasmatische Fibrillen verlaufen, die alle in einem Punkte in der Nähe des vorderen Kernes zusammenfallen. Nach der Vermutung *Engelmanns* dienen diese Fibrillen zur Reizleitung. Damit wäre eine anatomische Grundlage dieser „Ganzheit“ gegeben.

Es folgt also aus meinen Versuchen, daß die Störung des Ganzen den Regenerationsreiz bildet. Als Folge einer Entfernung eines Bewegungsorganes wird das Zusammenwirken derselben oder ihre Koordination gestört, und eben das stellt den Reiz dar, welcher die Wirkung der Regenerationsfaktoren, die freilich recht verschiedenartiger Natur sein können, auslöst.

Eine nähere Erkenntnis dieser Faktoren bleibt uns vorläufig vor-enthalten, doch wirft die durch diese Untersuchungen festgestellte tiefe Analogie zwischen Regeneration und Ontogenese ein gewisses Licht auf die ganze Frage.

Im Versuch 7 habe ich systematisch den Beschädigungsgrad vermindert, wobei ich die Gültigkeit der von vielen Autoren vertretenen Regel, daß die Regeneration um so schneller verläuft, je größer die Beschädigung ist, auch an *Stylonychia* prüfen wollte. Es ist von Interesse, das Ergebnis des Versuches 19 in diesem Zusammenhang zu betrachten. Bei wiederholter Regeneration erhielt ich immer kleinere Individuen, jedoch blieb stets die Dauer des Regenerationsprozesses von der Größe des regenerierenden Stückes unabhängig. Nochmals spricht das dafür, daß der Regenerationsreiz in einer Störung des Ganzen des Organismus gesucht werden muß. Nicht die absolute Beschädigungsgröße, sondern der Grad der Störung der Körperproportionen entscheidet über die Dauer des Prozesses. Im Versuch 15, bei längerem Durchschneiden des Infusors, enthielt in einigen Fällen das regenerierende

Stück keinen einzigen Cirrus. Nichtsdestoweniger dauerte die Regeneration ebensolang, als die Regeneration eines anderen Stückes, welches die sämtlichen Cirren enthalten hatte. Die Dauer des Regenerationsprozesses hängt nicht von der Anzahl derjenigen Organe, die ersetzt werden sollen, ab, sondern es hängt auf das engste damit zusammen, welche Zeit notwendig ist, um die ersetzenden Organe zu bilden. Also bleibt die Dauer der eigentlichen Regeneration stets dieselbe. Dagegen setzt die Regeneration um so früher ein, je größer die Beschädigung war. Der oben angeführte Satz bedarf demnach einer Berichtigung, da die sogenannte Regenerationszeit eine Summe zweier Prozesse darstellt.

Ergebnisse.

1. Die Regeneration von *Stylonychia* bei Erhaltung beider Kerne erfolgt stets im Zusammenhang mit Entstehung eines einzelnen Regenerationsfeldes in der Nähe des Vorderkernes. Das hintere Feld entwickelt sich nur dann, wenn der vordere Kern entfernt wird.

2. Jede Regeneration von *Stylonychia* ist mit einer vollständigen Reorganisation des gesamten Cilienapparates verbunden.

3. Der Verlauf der Regeneration entspricht genau der bei normaler Teilung stattfindenden Reorganisation. Der einzige Unterschied besteht darin, daß das Regenerationsfeld stets einzeln auftritt.

4. Schon in frühen Stadien der Teilung bilden die beiden neuentstehenden Individuen autonome physiologische Einheiten.

5. Der Regenerationsprozeß ist streng determiniert, diese Determination hat aber einen ausschließlich physiologischen Charakter.

6. Die kernlosen Stücke machen niemals die echte Regeneration durch.

7. Bei wiederholter Regeneration ohne Nahrungsaufnahme gelingt es Individuen, die mehr als 1000 mal kleiner als die normalen sind, zu erhalten.

8. Die Amputation nur eines beliebigen Cirrus ruft eine vollständige Reorganisation aus.

9. Die Dauer des Regenerationsprozesses ist von der absoluten Beschädigungsgröße unabhängig.

10. Der Zeitintervall, nach welchem die Regeneration des operierten Individuums einsetzt, steht im reziproken Verhältnis zur Beschädigungsgröße.

11. Anschneiden des Körpers in verschiedenen Richtungen sowie Entfernen von Protoplaststücken, die keinerlei Cirren oder Cilien enthalten, bewirken keine Regeneration.

12. Der Regenerationsreiz besteht in einer Störung der Koordination von Bewegungsorganen.

Literaturübersicht.

1. *Balbani, E.*: Recueil Zool. Suisse 5, 1. 1888; Ann. de micrograph 4, 369. 1892. — 2. *Bordage, E.*: Bull. scient. de la France et de la Belgique 49, 199. 1916. — 3. *Bütschli, O.*: Bronns Class. Ordng. Abt. 3. 1889. — 4. *Bartsch, O.*: Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsmech. 99, 187. 1923. — 5. *Child, C. M.*: Biol. bull. of the marine biol. laborat. 36, 133. 1919. — 6. Derselbe: Ebenda 26, 36, 1914. — 7. *Czviklitzer*: Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 19, 140. 1905. — 8. *Driesch, H.*: Ebenda 5, 9, 11, 899. 1897, 1901. — 9. Derselbe: Ebenda 14, 247. 1902. — 10. *Engelmann, T.*: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 23, 1880. — 11. *Hartmann, M.*: Biol. Zentralbl. 42, 364. 1922. — 12. *Ishikawa, N.*: Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 35, 1. 1913. — 13. *Korschelt, E.*: Verhandl. d. dtsh. zool. Ges. 1898. — 14. *Maas, O.*: Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 30, 356. 1910. — 15. *Maupas, E.*: Arch. de zool. exp. et gén. 1. 1883. — 16. *Minkiewicz, R.*: Trav. de la Soc. Nat. de Kasan 35, 1. 1901 (russisch mit französischer Zusammenfassung). — 17. *Nusbaum, J.* und *Oxner, M.*: Zeitschr. f. wiss. Zool. 107, 78. 1913. — 18. *Prowazek, S.*: Arch. f. Protistenkunde 3, 45. 1903. — 19. *Przibram, H.*: Regeneration. Wien, Deuticke 1909. — 20. *Stein, F. v.*: Der Organismus der Infusionstiere usw. Abt. I. Hypotricha, Leipzig 1859. — 21. *Wallengren, H.*: Zool. Jahrb., Abt. f. Anat. 15, 1. 1901.

PRACE PAŃSTWOWEGO MUZEUM ZOOLOGICZNEGO.

Annales Musei Zoologici Polonici.

Tom VIII, zeszyt 2, 1929.

- I. STACH: Eine neue *Japyx*-Art aus Kleinasien (*Apterygogenea*). —
W. ROSZKOWSKI: Contributions to the study of the family *Lymnaeidae*. —
J. STACH: *Lepismachilis feminata* n. sp., eine neue isländische Machiliden-
Art (*Thysanura*).

Adres Redakcji: Warszawa, Państwowe Muzeum Zoologiczne.

ARCHIWUM HYDROBIOLOGJI I RYBACTWA.

Tom IV, zeszyt 1—2, 1929 (cena tomu w prenumeracie 10 zł.).

- L. RETOWSKI: Materjały do biologji planktonu zbiorników zalewowych
na zasadzie badań w delcie rzeki Wołgi. Referaty, notatki, bibliografja.

Adres redakcji i administracji: Suwałki, Stacja Hydrobiologiczna na
Wigrach (Instytut im. Nenckiego).

FOLIA MORPHOLOGICA.

(Organ Polskiego Towarzystwa Anatomiczno-Zoologicznego).

Tom I, zeszyt 2—3, 1929 (cena 6 zł.).

- J. TUR: Studia Teratogenetica. II. Les monstres incohérents. — T. MAR-
CINIĄK i K. SERAFIN: W sprawie unerwienia łuku mięśniowego pachy przez
nerw międzyżebrowo-ramienny u człowieka. — P. SŁONIMSKI: W sprawie
składników komórkowych i ich pochodnych we krwi *Batrachoseps aten-
nuatus* Esch. — Z. ZAKOLSKA: Przypadki partenogenetycznego podziału jaj
w jajniku szczura. — A. RODRIGUES, L. DE PINA et S. EREIRA: Dissection
d'un Nègre de Mozambique. — E. LEBLANC, M. RIBET, P. GOINARD, G. CHE-
VAUX, H. EZES, E. CURTILLET, F. MORAND: Recherches sur 40 Sujets indigè-
nas d'Algérie (Berbères). — Referaty. — Polskie Towarzystwo Anatomiczno-
Zoologiczne. — Personalia.

Adres redakcji i administracji: Warszawa, Chałubińskiego 5.

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNA I SPOŁECZNA.

Tom XII, zeszyt 3—4, 1930.

- LANDAU i GLASS. Badania nad związkim wzajemnym, zachodzącym
między czynnością wydzielniczą żołądka a gospodarką chlorową i kwasowo-
zasadową ustroju. — S. K. KON. Nowe badania nad regeneracją hemoglo-
biny i djetycznym leczeniem anemji. — S. ŁAGUNA. Pozorny brak receptora
A w grupie AB. — D. BERGER. Z badań nad biologją *B. Coli*. — Z. SZWOJ-
NICKA i T. ZAWADZIŃSKI. Próba odchylenia dopełniacza w rzeżące u ko-
biet. — F. PRZESMYCKI i ZEKL. Z badań nad biochemją ciał antygenowych

Adres redakcji: Warszawa, Chocimska 24.



Drukarnia i Litografia
„JAN COTTY”
w Warszawie, Kapucyńska 7.