

PL ISSN 0065-1583

POLISH ACADEMY OF SCIENCES  
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

# ACTA PROTOZOO- LOGICA

VI INTERNATIONAL CONGRESS  
OF PROTOZOOLOGY

Warszawa, Poland 5-11 July 1981

VOLUME 20  
Number 3

W A R S Z A W A 1 9 8 1

POLISH ACADEMY OF SCIENCES  
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

**ACTA PROTOZOLOGICA**  
**International Journal of Protozoology**

*Editors*

Stanisław DRYL and Stanisław L. KAZUBSKI

*Editorial Board*

Chairman: Leszek KUŹNICKI  
Vice-chairman: Andrzej GRĘBECKI

*Members*

Stanisław DRYL	Jiří LOM
Vassil GOLEMANSKY	Georg Ivanovič POLJANSKY
Witold KASPRZAK	Igor Borysovič RAIKOV
Stanisław L. KAZUBSKI	Ksenia Mironovna SUKHANOVA

*Managing Editor and Editorial Board Secretary*

Julitta PŁOSZAJ

Manuscripts may be submitted to the Editorial Office: Acta Protozoologica, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093, Warszawa, 3 Pasteur Street, Poland, or to each member of the Editorial Board.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

ACTA PROTOZOLOGICA appears quarterly. The indexes of previous volume will appear in No. 1 of the next volume.

Indexed in Current Contents.



C. MICELI, P. LUPORINI and P. BRACCHI

Morphological Description, Breeding System, and Nuclear Changes  
During Conjugation of *Euplotes raikovi* Agamaliev  
from Mediterranean Sea<sup>1</sup>

Received on 15 December 1980, revised on 20 February 1981

*Synopsis.* *Euplotes raikovi* has been collected from the Adriatic Sea. The 27 stock which developed in the laboratory could be assigned to 12 different mating types. Heterotypic as well as homotypic type of pairs form in the mixtures. However, as a rule, a mixture contains only one of the two types. During conjugation, the micronucleus undergoes a preliminary mitotic division followed by three pregamic divisions, while the macronucleus breaks into two pieces. Of these, that piece positioned posteriorly in the exconjugant cell persists, by taking a close association with the macronuclear anlage, even after the anterior piece has completely disappeared. In mating combinations involving one particular stock, some stages of the micronuclear maturation frequently occurs with a slight asynchrony between the two mate-partners. During reorganization following conjugation, the synkaryon divides twice. The macronucleus of the exconjugant cell appears to derive from a product of either the first or the second metagamic division.

We isolated 32 specimens of a marine species of *Euplotes* from a single one-liter sample of sea water and sand collected from the beach, protected from the wave action, at Porto Recanati (Adriatic Coast of Italy). These specimens were identified as belonging to the morphological species *Euplotes raikovi* after studying 27 stocks which developed in our laboratory (five individuals were not viable). This is the first collection of *E. raikovi* from the Mediterranean Sea. This species was originally described by Agamaliev (1966, 1967) on specimens collected from the Caspian Sea and was later redescribed by Washburn and Borror (1972) on specimens collected from the Atlantic Coast of New Hampshire. However, nothing is known about the breeding structure of *E. raikovi*. Out of the other 22 marine species of *Euplotes* which,

<sup>1</sup> Work supported by the Italian C.N.R.



like *E. raikovi*, show a dorsal argyrome of the "double type" (terminology of Gates and Curds 1979), has been reported by Kosaka (1973) the existence of 13 different mating types in *E. woodruffi*.

In this report, we give a description of the morphology of the *E. raikovi* population from the Mediterranean Sea and the results of a preliminary study of its breeding structure.

## Materials and Methods

The sea water sample from which we isolated the *E. raikovi* specimens (on the same day of collection), was taken on the morning of June 13, 1979. It contained coarse grains of sand, was rich in organic sediment, and had the salinity of 31‰. The isolated specimens were fed with *Dunaliella tertiolecta* grown in Walne medium (Walne 1966) (furnished by Dr. P. Trotta, C. N. R. Laboratory of Lesina, Italy) at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  on a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness. Under this culture conditions, *E. raikovi* grows with a fission rate of 9–10 h. This was calculated by observing how much time 30 dividers, simultaneously isolated from a log-phase culture, took to divide again.

Silver impregnated specimens were prepared according to the method of Chatton and Lwoff following the modification of Corliss (1953). To study the nuclear apparatus, cells were fixed in Sanfelice and stained according to the Feulgen method or with acetoorcein and lactoacetoorcein. In this latter case, observation of nuclear apparatus was improved a little by squashing specimens between a coverslip and a slide.

Cells in stationary phase were mixed in three depression slides. Every mixture contained about  $2 \times 10^8$  cells in 0.5 ml of culture medium taken from each stock. Simultaneously with the preparation of each mixture, about  $4 \times 10^8$  non mixed cells in 1 ml of culture medium were isolated and checked for the presense of autogamy and selfing. Autogamy was never observed but selfer pairs were occasionally formed. The results obtained in the mixtures were considered valid only when selfer pairs did not appear in the non-mixed control cells. The intensity of the conjugative reaction in the mixtures was estimated by the percentage of cells that united in pairs within 5 h of mixing.

The nuclear events during the conjugation and the exconjugant reorganization were studied at 1 h intervals right after cells paired. Samples of pairs we studied were synchronous. This synchronization was obtained by the following method suggested by Dr. F. Dini. Food was added to the mixture 30 min after formation of the first pairs. Cells which already were firmly paired could not feed and progressed through conjugation. By contrast, single cells as well as cells not firmly paired started feeding thus becoming to pair.

## Results

### Morphological Observations (Pl. I)

Cultures we observed were starved 3 to 4 days so that cells would be homogeneously accumulated in the  $G_1$  cell cycle stage. This was inferred by noting the absence of macronuclear replication bands in



Feulgen stained specimens prepared concurrently with the silver-impregnated specimens examined for morphology.

The body shape is ellipsoidal and the size ranges from 24 to 28  $\mu\text{m}$  in width and from 38 to 44  $\mu\text{m}$  in length. The dorsal argyrome shows large polygons on the left and small polygons on the right of the kineties, as typically occurs in one of the two forms of the "double-patella" type dorsal argyrome (subclassification of the double type argyrome proposed by *Curds* 1975). Regularly, we counted seven kineties of which five were dorsal and two were latero-ventral. The numbers of kinetosomes for each kinety were remarkably constant: 4, 9, 10, 11, 10, 10, and 10, respectively, starting from the postoral (No. 1) kinety. The number of membranelles in the AZM, extending over a surface of 28 to 30  $\mu\text{m}$ , ranges from 27 to 30. The number and relative disposition of the cirral basal plaques into organized arrays on the ventral surface are shown in Pl. I 5. The fronto-ventral array consists of seven plus one plaques. We paid particular attention to the existence of the eighth plaque, marked as 2/V in the *Wallengren* system (1960), because this plaque can either be absent in at least a part of the cell population (*Agamaliiev* 1966, 1967), or present, although without cilia, in each cell (*Washburn* and *Borrer* 1972). We did not detect the 2/V plaque in 28 out of 100 apparently well silver-impregnated specimens of stock No. 24 that we selected for this examination. This plaque, when present, always appeared barren; indeed, beating cilia were never observed in its correspondence by interference contrast optics. The rectangular plaques of the five transverse cirri form a distinct V-shaped pattern composed of unequal branches. There are three plaques of caudal cirri and one of these is located on the far left margin of the body, at the level of the transverse cirri.

The nuclear apparatus consists of a hook-shaped macronucleus having, usually, a knob-like bulge at its base and one or, occasionally, two micronuclei averaging 1.8–2  $\mu\text{m}$  in diameter.

### Stock Interactions

All the possible paired combinations of the 27 stocks were prepared. From the analysis of the results, reported in Table 1, we found that the 27 stocks can be grouped in 12 different mating types, designated by roman numerals from Mt I to Mt XII. Six mating types were each represented by a single stock. The other six mating types were noted in more than one stock; for instance, stocks No. 1, 9, 22, 25, and 29 expressed Mt I.

Table 1

Mating types	I			II			III			IV			V			VI	VII			VIII	IX	X	XI	XII												
	Stocks	1	9	22	25	29	2	10	11	12	3	4	7	5	8	17	19	13	14	31	18	23	24	26	27	28	30	32								
I	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
	9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
	22	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	29	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
II	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
III	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VIII	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XII	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Distribution of the stocks in the mating types from I to XII and intensity of the conjugative reaction in the mixtures obtained by mixing the stocks in all possible combinations two by two. +++ more than 60% cells in pairs; ++, from 30% to 60% cells in pairs; +, less than 30% cells in pairs; -, no conjugative reaction



The intensity of the conjugative reaction appeared, in general, to be remarkably high between all the combined mating types. This is particularly true if we consider the most reactive stock as mating type representative, when more than one stock expressed the same mating type. In fact, such mating-type-identical stocks ordinarily did not show the same intensity of the conjugative reaction. One stock more than the others of its group, regularly appeared as more mating reactive. For example, among stocks No. 3, 4, and 7, all of Mt III, we obtained from 50 to 80% cell in pairs in almost all the mating combinations involving stock No. 7. By contrast, such intense conjugative reactions were never observed when we mixed stock No. 3 and seldomly observed when we mixed stock No. 4.

Homotypic pairs formed, continued into meiosis, fertilization, and nuclear reorganization, in more than half the mixtures that were studied. To study the type of pair (i.e., homotypic or heterotypic) we chose, at random among the most reactive stocks, five stocks (No. 19, 23, 28, 29, and 30) each of a different mating type. From each of the ten two-by-two mating combinations, ten initial pairs were isolated and the mates forced to separate by the split pair method (Sonneborn 1950). The separated mates were supplied with food enough to reproduce for one week. Then, the cell lines so obtained were tested against the two mating types brought together into the original mixture. The results are shown in Table 2. Four mixtures yielded pairs of heterotypic type exclusively. Five mixtures gave rise only to homotypic pairs, that were all of the same kind (for instance, only pairs 28-28 were found in the

Table 2

CROSSES	TYPE OF PAIRS	
	heterotypic	homotypic
19 x 23	10	0
19 x 28	0	10 (28-28)
19 x 29	10	0
19 x 30	10	0
23 x 28	0	10 (23-23)
23 x 29	0	10 (23-23)
23 x 30	0	10 (23-23)
28 x 29	10	0
28 x 30	0	10 (28-28)
29 x 30	3	7 (30-30)

Occurrence of different types of pairs in the mixtures involving stocks No. 19 (Mt IV), 23 (Mt VII), 28 (Mt X), 29 (Mt I), and 30 (Mt XI)



mixture between stock No. 19 and stock No. 28). Lastly, one mixture contained both heterotypic and homotypic pairs in varying proportions.

The two stocks No. 23 and 28 also appeared able to form homotypic pairs spontaneously, i.e., to undergo selfing. These selfer pairs appeared discontinuously and ordinarily involved no more than 10% of any cell culture of the two stocks.

### Nuclear Changes During Conjugation (Pl. II)

Usually an induction period of less than 1 h is sufficient for appropriately prepared cells of any two of the different mating types to start agglutinate in a mating reaction. During this reaction that lasts about 10 min and ends in firm pair formation, *E. raikovi* displays a mating behavior which passes through the typical sequence of stages previously described in other species of *Euplotes*, such as *E. crassus* (Heckmann and Siegel 1964, Verni et al. 1978) and *E. cristatus* (Wichterman 1967).

The micronucleus is seen to swell as it starts maturation, about 50 min after cell union. It undergoes a preliminary mitotic division followed by three pregamic divisions before originating two pairs of pronuclei resulting in one pair positioned anteriorly and the other posteriorly along the fusion region between the two mate-partners. Regularly, one nucleus of each pair becomes picnotic while the other remains as a functional pronucleus.

Spherical and rod-shaped chromatin bodies, some of which appeared as connected by thin strands, were quite distinctly resolved in the two late prophase nuclei of the first pregamic division in 4 h old pairs. Approximately, the number of the chromatin bodies was 70–80.

Micronuclear maturation not always occurred synchronously in both the pair partners. This was particularly seen in 5–6 h old pairs of the mixtures involving stock No. 19, where one mate already contained the eight products of the second pregamic division, but its partner still had the four products of the first pregamic division.

In a few rare instances observed in mixtures among stocks No. 24, 10 and 28, three cells united in conjugation in a situation that closely resembles the situation described by Preparata and Nanney (1977) in *Tetrahymena*. Micronuclei underwent maturation in all three members of these triplets. However, one of the three members invariably had its micronucleus in a stage of maturation greatly delayed when the other two mating partners were ready for the pronuclear exchange.

The macronucleus breaks down quite late during conjugation. It appeared divided in two pieces in 7 h old conjugants when the four final



haploid pronuclei are detected. One piece is positioned anteriorly; it becomes spherical, well stainable, and tends to decrease in size until it disappears in 24 h old exconjugants. The other piece is positioned posteriorly; it assumes a triangular shape, appears less stainable, and comes into close association with the developing macronuclear anlage in the 24 h old exconjugants. It appears likely that, at least in some instances, this posterior piece is able to reorganize and fuse with the macronuclear anlage, as it occurs in *E. eurystomus* (Turner 1930, Alonso 1974) and in *E. woodruffi* (Rao 1964).

Pronuclear exchange and synkaryon formation occur 1 h before the end of conjugation which itself lasts from 8 to 9 h, at the temperature of  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Eight hours from separation, exconjugant cells were found to contain either two or three metagametic nuclei in addition to the macronuclear anlage. After 24 h, all exconjugants contained a better stainable anlage and only one nucleus.

### Conclusions

The *E. raikovi* population from the Adriatic Sea differs in some morphological traits from those populations described by Agamaliiev (1966, 1967) and by Washburn and Borrer (1972). The differences mainly consist of: (1) a smaller sized body (24 to 28  $\mu\text{m}$   $\times$  38 to 44  $\mu\text{m}$  against a length of 50 to 60  $\mu\text{m}$  reported by Agamaliiev, and 31  $\times$  45  $\mu\text{m}$  reported by Washburn and Borrer); (2) a higher number of kinetosomes in kineties No. 2 and No. 4 (9 and 11, respectively, against  $7 \pm 1$  and  $9 \pm 1$  reported by Washburn and Borrer). However, these differences may be regarded as normal intraspecific variations. Usually, both body size and kinetosome number per kinety have wide ranges of variability in the *Euplotes* species (see Curds 1975). The 2/V plaque present, although barren, in two thirds of the stock No. 24 (and absent in the remaining third) generates a situation of polymorphism in the number of fronto-ventral cirral plaques among genetically identical cells. This not uniform presence of the 2/V plaque, that occurred also in the Caspian population (Agamaliiev 1967), has a close parallel in a clone of *E. parkei* described by Curds (1975). Wider variations in the total number of fronto-ventral cirri have been reported in *E. tuffraui* (Berger 1965) and in *E. vannus, mutabilis* form (Tuffrau 1977).

The finding that 12 different mating types are present among the 27 stocks which we have analyzed, suggests that the mating type sy-



stem of *E. raikovi* is a multiple system as it seems widespread among hypotrichous ciliates and, in particular, among the species of *Euplotes* showing a dorsal argyrome of the single (-vannus) type (see Dini and Luporini 1979, for appropriate references). However, instances of incompatibility between two mating types occurred as frequently as instances of compatibility. In fact, in a seemingly strict analogy with what has been found in the American population of *E. patella* (Kimball 1942, Powers 1943), the constitution of homotypic pairs appears as an almost obligatory choice for some particular mating types. Therefore, if we agree with G nermont (1977) that homotypic pairing can function as a mechanism of prezygotic separation, then it appears that such a mechanism operates in *E. raikovi* between individuals of the same geographical population. This should also mean that in *E. raikovi* mechanisms of sympatric speciation could be at work. Probably, also the occurrence of asynchrony in the nuclear maturation between the two mate partners could operate in preventing a free gene spreading. In fact, asynchrony during maturation could possibly interfere with the concerted pronuclear interchange between mates and, therefore, could favour a double self-fertilization in cytogamy.

The sequence of stages during the micronuclear maturation (one preliminary mitotic division followed by three pregamic divisions), confirms with what is known for all the other species of *Euplotes* thus far studied (see Wichterman 1967 and Raikov 1972, for pertinent references), with the exception of some *E. crassus*-like strains defective in the third pregamic division (Lueken 1974). At reorganization, during the development of the macronuclear anlage, the appearance first of either two or three nuclei and, then, of only one nucleus suggests that the synkaryon follows either two distinct pathways to reconstruct the vegetative nuclear apparatus. The synkaryon can divide consecutively twice, where one of the four products develops into the macronuclear anlage, one becomes the micronucleus and two degenerate. Otherwise, one of the first two mitotic products will develop into the macronuclear anlage, while the other one divides again giving rise to the micronucleus and a product that will degenerate.

#### REFERENCES

- Agamaliyev F. G. 1966: New species of psammobiotic ciliates of the western part of the Caspian Sea. *Acta Protozool.*, 4, 169-183.  
Agamaliyev F. G. 1967: Faune des cili s m sopsammiques de la c te ouest de la Mer Caspienne. *Cah. Biol. Mar.*, 8, 359-402.



- Alonso P. 1974: Partial regeneration of the old macronucleus in *Euplotes eurystomus*. *Protologica*, 10, 293-299.
- Berger J. 1965: The infraciliary morphology of *Euplotes tuffraui* n. sp., commensal in strongylocentrotid echinoids, with comments on echinophilous populations of *Euplotes balteatus* (Dujardin) *Ciliata*, *Hypotrichida*. *Protistologica*, 1, 17-31.
- Corliss J. O. 1953: Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton Lwoff technic. *Stain Technol.*, 28, 97-100.
- Curds C. R. 1975: A guide to the species of the genus *Euplotes* (*Hypotrichida*, *Ciliatea*). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, 28, 1-61.
- Dini F. and Luporini P. 1979: The multiple mating type system of the marine ciliate *Euplotes crassus* (Dujardin). *Arch. Protistenk.*, 121, 238-245.
- Gates M. A. and Curds C. R. 1979: The dargyrome of the genus *Euplotes* (*Hypotrichida*, *Ciliophora*). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, 35, 127-200.
- Génermont J. 1977: Isolating mechanisms between sibling species in marine *Euplotes*. In: *Proceedings of the Fifth International Congress of Protozoology*, (ed. S. H. Hutner), New York, 457, (Abstract).
- Heckmann K. and Siegel R. W. 1964: Evidence for the induction of mating type substances by cell to cell contacts. *Exp. Cell Res.*, 36, 688-691.
- Kimball R. F. 1942: The nature and inheritance of mating types in *Euplotes patella*. *Genetics*, 27, 269-285.
- Kosaka T. 1973: Mating types of marine stocks of *Euplotes woodruffi* (*Ciliata*) in Japan. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 1*, 24, 135-144.
- Lueken W. W. 1973: A marine *Euplotes* (*Ciliophora*, *Hypotrichida*) with reduced number of prezygotic micronuclear division. *J. Protozool.*, 20, 143-145.
- Powers E. L. Jr. 1943: The mating types of double animals in *Euplotes patella*. *Am. Midl. Nat.*, 30, 175-195.
- Preparata R. M. and Nanney D. L. 1977: Cytogenetics of triplet conjugation in *Tetrahymena*: origin of haploid and triploid clones. *Chromosoma*, 60, 49-57.
- Raikov I. B. 1972: Nuclear phenomena during conjugation and autogamy in ciliates. In: *Research in Protozoology*, (ed. T. T. Chen), Pergamon Press, 4, 147-289.
- Rao M. V. N. 1964: Nuclear behavior of *Euplotes woodruffi* during conjugation. *J. Protozool.*, 11, 296-304.
- Sonneborn T. M. 1950: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. exp. Zool.*, 113, 87-148.
- Tuffrau M. 1977: Variations intraclonales du phénotype ventral chez *Euplotes vannus*, forme *mutabilis*, Cilié Hypotriche. *Protistologica*, 13, 435-439.
- Turner J. P. 1930: Division and conjugation in *Euplotes patella* Ehr. with special reference to the nuclear phenomena. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 33, 193-258.
- Verni F., Rosati G. and Luporini P. 1978: Preconjugant cell-cell interaction in the ciliate *Euplotes crassus*: a possible role of the ciliary ampules. *J. exp. Zool.*, 204, 171-180.
- Wallengren H. 1901: Zur Kenntniss des Neubildungs und Resorptions-processes bei der theilung der Hypotrichen Infusorien. *Zool. Jb.*, 15, 1-58.
- Walne P. R. 1966: Experiments in the large scale culture of larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest. Lond.*, Ser. 2, 25, 1-10.
- Washburn E. S. and Borrer A. C. 1972: *Euplotes raikovi* Agamaliev, 1966 (*Ciliophora*, *Hypotrichida*) from New Hampshire: description and morphogenesis. *J. Protozool.*, 19, 604-608.
- Wichterman R. 1967: Mating types, breeding system, conjugation and nuclear phenomena in the marine ciliate *Euplotes cristatus* Kahl from the gulf of Naples. *J. Protozool.*, 14, 49-58.



#### EXPLANATION OF PLATES I-II

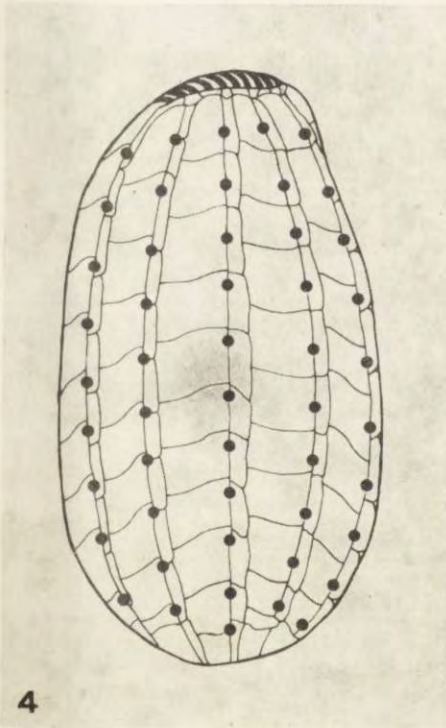
1 to 3: silver-impregnated specimens of *Euplotes raikovi* ( $\times 1050$ ). 1 — dorsal view showing the five kineties and the dorsal argyrome. 2 — ventral view of specimen with seven basal plaques of the fronto-ventral cirri. 3 — ventral view of a specimen with eight basal plaques of the fronto-ventral cirri, an arrow indicates the supernumerary plaque. In specimens of Figs. 2 and 3 the set of five basal plaques of the transverse cirri is clearly seen, while the basal plaques of the caudal cirri are only barely visible

4 and 5: drawings of silver-impregnated specimens in dorsal and ventral view, respectively

6 to 9: successive stages of nuclear maturation during conjugation. 6 — two nuclei in late prophase of the first pregametic division are visible in the mate partner on the viewer's right; in this instance the two pair mates have been slightly squashed ( $\times 1350$ ). 7 — the nuclei of the pair mates are in different stages of maturation; the mate on the right has the four products of the first pregametic division, while the mate on the left has the eight products of the second pregametic division ( $\times 1000$ ). 8 — the four final pronuclei produced by the third pregametic division are present in both pair mates; both macronuclei are separated in two pieces ( $\times 1100$ ). 9 — pronuclear exchange between the pair mates ( $\times 1100$ )

10 to 12: nuclear reorganization in exconjugants ( $\times 1100$ ). 10 — one of the two products of the first metagametic division has developed into the macronuclear anlage (asterisk), while the other product has divided producing two potential micronuclei (arrows). 11 — four products have been formed by two metagametic divisions; the three potential micronuclei are indicated by arrows and the macronuclear anlage is labeled with an asterisk. 12 — the non functional micronucleus (i) has (have) already disappeared and the exconjugant contains only one micronucleus (arrow) and a differentiating macronucleus (asterisk); in this last stage of nuclear reorganization, the anterior piece of the old macronucleus has disappeared

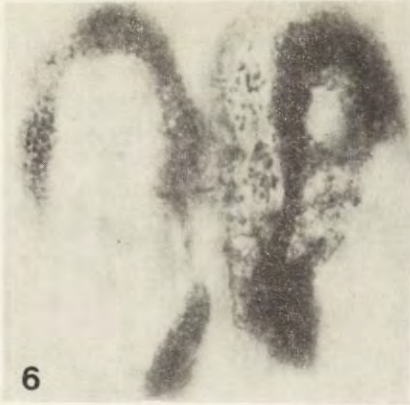




C. Miceli et al.

auctores phot.





6



7



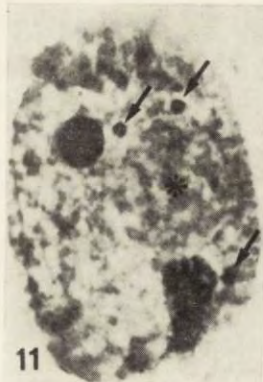
8



9



10



11



12

C. Miceli et al.

auctores phot.



Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Pisa, via A. Volta 4, Pisa, Italy

G. ROSATI, F. VERNI, R. NOBILI and M. ANGELI

Starvation in *Euplotes crassus* (Ciliata, Hypotrichida):  
Ultrastructure Modifications and Effects on Reproduction<sup>1</sup>

Received on 27 January 1981

*Synopsis.* The modifications consequent to periods of starvation at different lengths of time were studied in *Euplotes crassus* cells at the ultrastructural level. These modifications which appear very similar to those reported in aging cells, were also analyzed in relation to the reproductive behaviour of *E. crassus* cells, till they were irreversibly damaged.

It is well known that free living protozoa are relatively resistant to starvation. The adaptation to the deficiency of food occurs by means of different mechanisms. Among them encystment, reported for a variety of species (see Wagtenonk 1955), permits long periods of survival under extremely adverse conditions. Another means whereby many species of protozoa can survive the lack of food is cannibalism. This mechanism maintains the few at the expense of many. As frequently reported in the literature, the most conspicuous response of protozoa to food suspension is an often marked decrease in size. Dembowska (1938) showed that under starvation *Stylonychia* repeatedly reorganizes on a smaller scale until minute animals are produced. No reorganization process was found in other ciliates but only a progressive reduction in size of all the cell structures (Zhinkin 1930, Tartar 1961, Hirshfield et al. 1963).

The effect of starvation at the ultrastructural level was carefully analyzed in *Tetrahymena* (Levy and Elliot 1968), in *Euglena* (Buetow 1968) and in *Paramecium* (Fok and Allen 1979). In these species a prolonged starvation is characterized by the sequestration and the subsequent digestion of portions of the cytoplasm, a process that also

<sup>1</sup> Study carried out with the help of the C.N.R.



seems to occur in the liver cells of starved rats (Swift and Hruban 1964).

It has been observed in our laboratory during the course of some researches on the reproductive biology of *Euplotes crassus*, that after two days of starvation *Euplotes* cells are unable to undergo fission and after 4-5 days of starvation they lose their mating capability. A short period of starvation has been shown in some stocks of the species (Luporini and Bracchi 1973) to induce reorganization, a process reminiscent of that found in *Stylonychia* mentioned previously, however, not all the stocks available in our laboratory, underwent such a process. The effect of prolonged periods of food deprivation has not yet been analyzed. What we know from routine observations is that cannibalism and encystement are lacking in *E. crassus*.

In the present work we studied in detail the modifications consequent to various periods of starvation at the ultrastructural level. The purpose has been to analyze these modifications in correlation with the reproductive behaviour of *E. crassus* cells until they were irreversibly damaged, that is when they were unable to divide even if reintroduced to an abundant food supply.

### Material and Methods

*Euplotes crassus* cells of strains W<sub>2</sub> and G<sub>12</sub> grown in our laboratory using the technique described earlier by Nobili (1965) were used. These cells at the stationary or log phase of growth were washed with and suspended in sterile artificial sea water, to obtain a complete starvation. After 2, 4, 7, 9, 10, 14 and 15 days of starvation under sterile conditions, about 50 cells were taken with a micropipette and fixed for electron microscopy.

A double fixation was used: glutaraldehyde 5% in a 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4, containing sucrose (10%) and CaCl<sub>2</sub> (0.03%), followed by OsO<sub>4</sub> in the same buffer. The cells were then dehydrated in a graded series of alcohols and embedded in epon-araldite mixture. For each fixation 5 cells were observed. No fixation were made after 15 days of starvation because at this time the cells were irreversibly damaged. Starved cells were also checked for the fission rate and then mixed together for mating at different time intervals from the onset of starvation. No cell divided after 2 days and very few pairs appeared in the mixture after 5 days of starvation.

### Results

The main characteristic of cellular organelles in normally fed cells was first analyzed to be used as control. The general, fine morphology of these cells was very similar to that described in more detail by many authors (Fauré-Fremiét et André 1968, Nobili and Ro-



sati Raffaelli 1971, Verni et al. 1978). In Pl. I 1-3 the most important organelles of well fed cells with the exception of the nuclei are reported to evidence their structure in a precise way. In Pl. I 1 the terminal portion of the mouth with the oral discs can be seen together with a newly formed food vacuole lined up by tiny electron dense mitochondria. In Pl. I 2 a cortical portion of the cell is shown including a large mitochondrion, a vast amount of glycogen and cortical ampules filled by electron dense material. Shown in Pl. I 3 are food vacuoles during various stages of digestion and, in the inset, a bacteria endosymbiont. The endosymbionts in well fed cells are constant in number and this number is typical for each stock (Rosati et al. 1976).

The overall structural organization of cells starved for 2-4 days does not vary greatly in comparison with the control cells, however, some modifications are apparent. The food vacuoles reduce in number and contain only digested filamentous material. The lipid droplets appear to group in nests (Pl. II 4) and in the 4th day of starvation their diameter increases from 0.5-1 up to 2  $\mu\text{m}$ . In the cells starved for 2 days the cortical ampules are empty in the 70-80% reaching 100% after 4 days of starvation. The most relevant phenomenon occurring in the first 4 days of starvation, is the appearance of cytoplasmic vesicles delimited by a double membrane with the internal cytoplasm quite rarefied as if it were digested (Pl. II 5). A starvation of 7 days markedly effects the cytoplasmic reserve material by a complete disappearance of glycogen and a great reduction of lipid droplets. Moreover, the cytoplasmic vesicles mentioned above increase in number and in size by fusing together (Pl. II 6), the oral discs enlarge and appear less compact and electron dense (Pl. II 7), and the disarrangement of their fibrous content continues until after 10-14 days of starvation, the content is finally broken down (Pl. II 8). Even large sized mitochondria show signs of degradation with the myelinic figures associated with their membrane (Pl. III 9), while the smaller mitochondria do not appear to be affected by prolonged starvation. The bacteria endosymbionts, which were scanty in well fed cells (1.06 and 1.55 per 100  $\mu\text{m}^2$  respectively in the two stocks used), increased in number starting from 4 days of starvation. After 7 days, dividing endosymbionts could still be found and at the 10th day of starvation they reached the average concentration of 4 per 100  $\mu\text{m}^2$  in both stocks. Only after 14 days of starvation some endosymbionts began to break down, their membranes opened and their internal material was reversed in the host cell cytoplasm (Pl. III 10). The macronucleus showed some modifications starting from 7 days of starvation; its chromatin became more condensed and the nucleoli first decreased in number and then after 14 days completely disappear-



ed. At this time inside cytoplasmic vesicle near the macronucleus, a granulous material very similar to the chromatin, could be observed (Pl. III 11). No change could be observed in the fine structure of the pellicle, the ciliary organelles or the microtubules.

### Discussion

Starvation in ciliates should be considered a common occurrence in nature but how long the ciliates can withstand this condition without being irreversibly damaged is known only in a few cases (Hirshfield et al. 1963). A moderate starvation period appears to be a necessary condition for sexual reproduction in many species, although it is not sufficient in some instances in bringing about mating (Bruns and Brussard 1974).

In the strains of *E. crassus* here analyzed, sexual reproduction is a common phenomenon in mixed cells of complementary mating type starved as long as 5 days. Afterwards mating becomes very sporadic and ceases to occur at all in 7 days starved cells (Nobili, unpublished results). Accordingly, the ultrastructural modifications observed during the time corresponding to the prospective mating period are very minor and consist of a size increase in lipid droplets and a decrease in number down to almost 0 of filled cortical ampules. The increase in lipids was also found in *Tetrahymena pyriformis* after a short period of starvation (Seaman 1955, Levy and Elliott 1968). What this means in physiological terms remains obscure. The lack of material in the cortical ampules, in spite of the relevance this material has for conjugation (Verni et al. 1978), does not prevent these cells from reproducing sexually. The ampule contents are rebuilt and/or relocated upon mixing complementary cells (Verni et al. 1980) provided they are not too starved. That cells after 4-5 days of starvation are not over starved is shown by the abundance of nutritional reserve such as glycogen particles and lipid droplets still present in their cytoplasm. In contrast to this, the reserve material is nearly exhausted in 7 days starved cells when conjugation is no longer possible. This correlation, lack of food reserve and loss of the mating capability, could simply mean that sexual reorganization, among other things, is a metabolic demanding process not supported by severe starvation.

The other modifications occurring as starvation proceeds deserve some comments also. The appearance of membranous vesicles surrounding cytoplasmic portions of the cell, the degeneration of some of the large mitochondria, the reduction and final loss of macronuclear nucleoli with vesicles containing chromatin-like bodies near the macronucleus



and the disarrangement of the internal packed membranes of the oral discs may all be considered as phenomena pertaining to the same involutonal process caused by the prolonged starvation in the physiology of the cell. Some of these phenomena have been described in starved or in aging cells of both protozoa (Levy 1973, Sunderaraman and Cummings 1976) and metazoa (Swift and Hruban 1964). The double membrane segregating portion of cytoplasm though not investigated cytochemically and the meylinic figures visible at a pole of degenerating mitochondria, are likely to be autophagic in nature for analogy with similar structures observed by Levy and Elliott (1968) in starving *Tetrahymena*. Similarly the loss of macronuclear nucleoli parallels the situation of starved *Tetrahymena* cells where according to Cline and Conner (1966) 30% of the total cell RNA is broken down. The internal cytoplasmic membranes show a normal structure during starvation with the exception of those packed within the oral discs. The fact that these membranes are not preserved may be due to their "immature" structure consisting perhaps of only phospholipids and, therefore, more easily accessible for enzymes to provide energy for the starving cell. This hypothesis is partly supported by the observation on *Diophrys* in which the internal membranes of the oral discs are easily extracted by simple oxidation with  $H_2O_2$  (Rosati Raffaelli 1970). The only structures which seemingly remain unmodified during starvation are the small electrondense mitochondria normally found surrounding food vacuoles which encircle the autophagic vesicles during starvation. Their function might be that of providing in both cases, the essential energy for either digestion or autodigestion. The endosymbionts in starving cells appear to thrive well as they increase in number up to a certain point, but in the end they too are broken down and disappear when the cells are irreversibly damaged. Different behaviour of endosymbionts have been reported by Soldo et al. (1966) in relation to starving cells of *Paramecium* in which they may either disappear or reproduce until the host cell breaks down. The intimate relationships between endosymbionts and ciliate cells are various and, accordingly, different results are to be expected even under similar conditions.

We can conclude, however, in the strains analyzed, which neither encyst or show cannibalism, or undergo reorganization of any sort, that starvation brings about a series of modifications mimicking clone aging so that unneeded cell parts are used to provide the organism with nutrients. These modifications are accompanied by the lack at first of vegetative and later of sexual reproduction which finally leads to cell death.



## REFERENCES

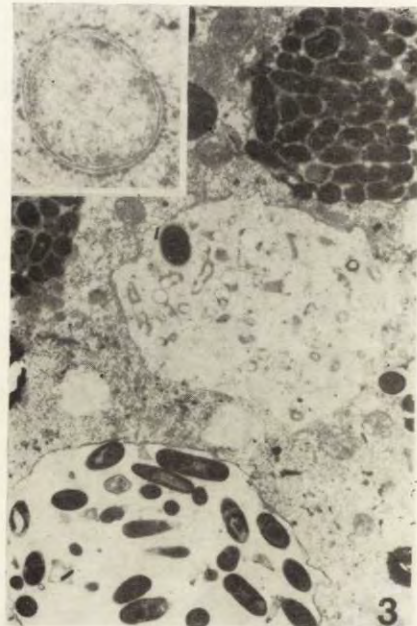
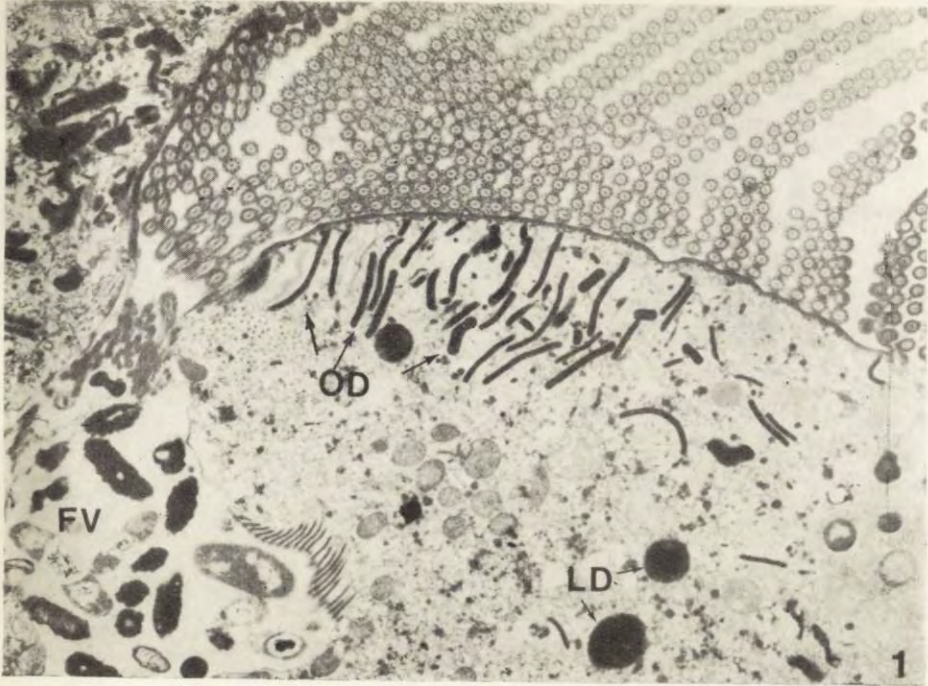
- Bruns P. J. and Brussard T. B. 1974: Pair formation in *Tetrahymena pyriformis* an inducible developmental system. *J. Exp. Zool.*, 188, 337-344.
- Buetow D. E. 1968: Morphology and ultrastructure of *Euglena*. In: *The Biology of Euglena* (ed. Buetow D. E.) Academic Press New York, London, pp. 110-184.
- Cline S. and Conner R. L. 1966: Orthophosphate excretion as related to RNA metabolism in *Tetrahymena*. *J. Cell Physiol.*, 68, 149-156.
- Dembowska W. S. 1938: Korpeneorganisation von *Styloynchia mytilus* beim Hungem. *Arch. Protistenk.*, 91, 89-105.
- Fauré-Fremiet E. and André J. 1968: Structure fine de l'*Euplotes eurystomus* (Wrz.). *Archs Anat. microsc. Morph. exp.*, 57, 57-78.
- Fok A. K. and Allen R. D. 1979: Axenic *Paramecium caudatum*: morphological changes during starvation. *J. Protozool.*, 26, 13A.
- Hirshfield H. J., Chunosoff L. and Vasanthi Bhandary A. 1963: Macronuclear variability of *Blepharisma* associated with growth. In: *Cell Growth and Cell Division* (ed. Harris R. J. C.) Academic Press New York London, pp. 27-56.
- Levy M. R. 1973: Effects of some environmental factors on the biochemistry, physiology and metabolism of *Tetrahymena*. In: *Biology of Tetrahymena* (ed. Elliott A. M.) Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania, pp. 227-257.
- Levy M. R. and Elliott A. M. 1968: Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation. *J. Protozool.*, 15, 208-222.
- Luporini P. and Bracchi P. 1972: Micronuclear behaviour in the life cycle of a plurimicronucleate strain of *Euplotes crassus* (Dujardin) (*Ciliata Hypotrichida*). *Monitore zool. ital.*, 7, 71-75.
- Nobili R. 1965: Mating types and their inheritance in *Euplotes minuta* Yocum (*Ciliata Hypotrichida*). *Atti Ass. Gen. ital.*, 10, 110-121.
- Nobili R. and Rosati Raffaelli G. 1971: The fine structure of the oral apparatus of some ciliate Hypotrichs. *Monit. zool. ital.*, 5, 65-80.
- Rosati Raffaelli G. 1970: La structure fine de *Diophrys scutum* (Dujardin). *Archs. Anat. microsc. Morph. exp.*, 59, 221-234.
- Rosati G., Verni F. and Luporini P. 1976: Cytoplasmic bacteria-like endosymbionts in *Euplotes crassus* (Dujardin) (*Ciliata Hypotrichida*). *Monit. zool. ital.*, 10, 449-460.
- Seaman G. R. 1955: Metabolism of free living ciliates. In: *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (eds. Hutner S. H. and Lwoff A.) Academic Press New York London, pp. 91-158.
- Soldo A. T., Godoy G. A. and van Wagtendonk W. J. 1966: Growth of particles bearing and particles free *Paramecium aurelia* in axenic culture. *J. Protozool.*, 13, 492-497.
- Sundararaman V. and Cummings D. J. 1976: Morphological changes in aging lines of *Paramecium aurelia*. I. Alteration in the cytoplasm. *Mech. Ageing Develop.*, 5, 139-154.
- Swift H. and Hruban Z. 1964: Focal degradation as a biological process. *Fed. Proc.*, 23, 1026-1037.
- Tartar V. 1961: Metabolism. In: *The Biology of Stentor* (ed. Tartar V.) Pergamon Press Oxford, pp. 261-262.
- Verni F., Rosati G. and Luporini P. 1978: Preconjugant cell-cell interaction in the ciliate *Euplotes crassus*: a possible role of the ciliary ampules. *J. exp. Zool.*, 204, 171-180.
- Verni F., Rosati G. and Luporini P. 1981: Activity of ciliary ampules through successive ages of the ciliate *Euplotes crassus*. *Experientia*, (in press).
- Wagtendonk W. J. 1955: Encystment and excystment of *Protozoa*. In: *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (eds. Hutner S. H. and Lwoff A.) Academic Press New York London, pp. 85-90.
- Zhinkin L. 1930: Zur frage der Reservestoffe bei Infusorien (Fett und Glykogen bei *Stentor polymorphus*). *Z. Morph. u. Ökol. Tiere. (Z. wissenschaftliche Biologie, Abteilung A.)*, 18, 217-248.

#### EXPLANATION OF PLATES I-III

- 1: Well fed cell: terminal portion of the mouth with the oral discs (OD), a new formed food vacuole (FV) and, near it, some little electrondense mitochondria. LD — lipid droplets. 9500 X
- 2: Well fed cell: cortical portion. Ripened ampules (RAs), glycogen particles (GI) and a large mitochondrion are visible. 28 000 X
- 3: Well fed cell: dorsal portion. Food vacuoles at different stages are present. 4800 X. In the inset: an endosymbiont. 14 000 X
- 4: 2 days starved cell: lipid droplets grouping in nests. 11 000 X
- 5: 4 days starved cell: two cytoplasmic vesicles delimited by a double membrane and containing rarefied cytoplasm are visible. E — endosymbiont. 14 000 X
- 6: 7 days starved cell: a little cytoplasmic vesicle is fusing with a large one. 13 000 X
- 7: 7 days starved cell: the oral discs (OD) are enlarged and their content is less compact than in well fed cells. 28 000 X
- 8: 10 days starved cell: the disarrangement of the fibrous content of oral discs (OD) is more accentuated. 38 000 X
- 9: 10 days starved cell: a myelinic figure is associated with the membrane of a large mitochondrion. 36 000 X
- 10: 14 days starved cell: an endosymbiont with the membrane broken down can be seen. 28 000 X
- 11: 14 days starved cell: a cytoplasmic vesicles (CV) containing rarefied chromatin like material can be seen near the macronucleus (Mn). MF — myelinic figures. 27 000 X



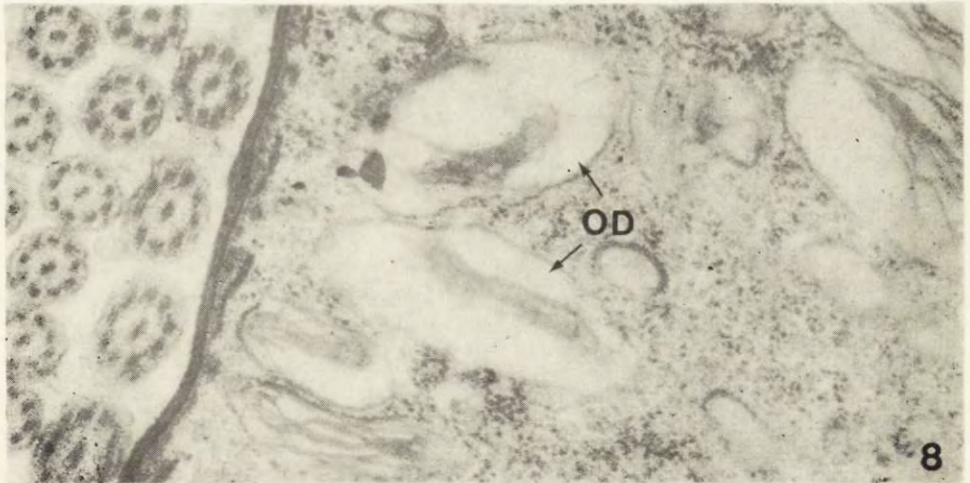
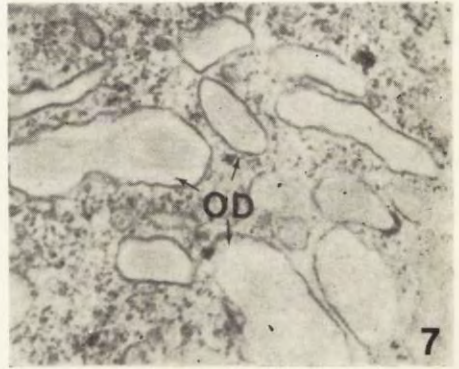
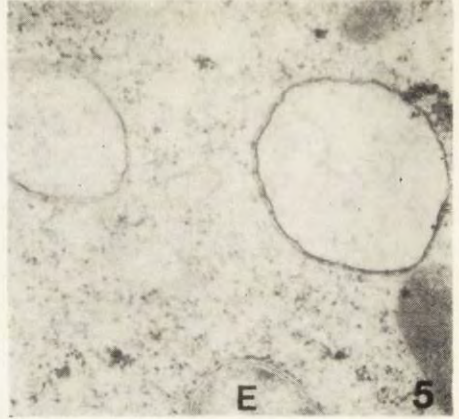
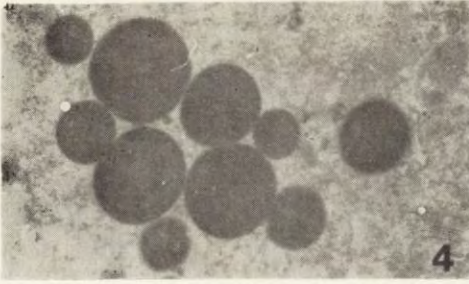




G. Rosati et al.

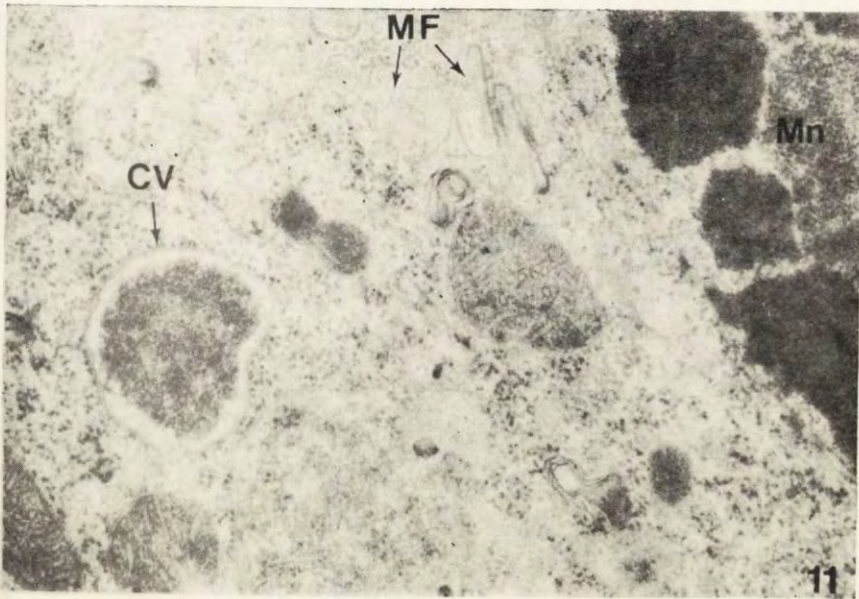
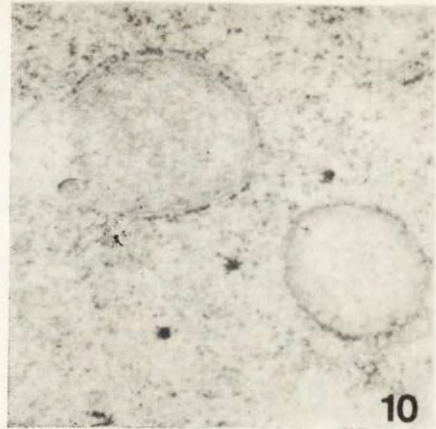
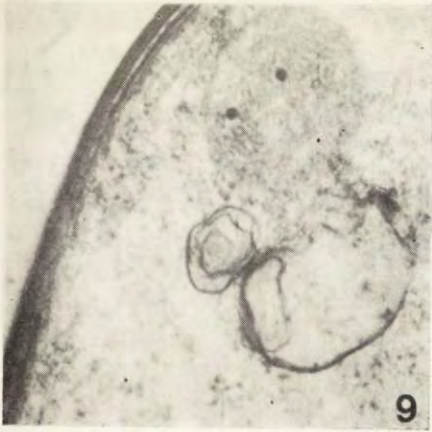
auctores phot.





G. Rosati et al.

auctores phot.



G. Rosati et al.

auctores phot.





Биологический институт Ленинградского Государственного Университета, Лаборатория зоологии беспозвоночных,  
Старый Петергоф Ленинградской обл. Ораниенбаумское шоссе 2, СССР

Laboratory of Invertebrate Zoology, Biological Research Institute, Leningrad State University,  
Leningrad 164, USSR

А. И. РАИЛКИН

A. I. RAILKIN

Выбор пищи инфузориями-седиментаторами (филтраторами)  
*Paramecium caudatum* Ehrbg. и *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Choice of Food by the Ciliates *Paramecium caudatum* Ehrbg. and *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Received on 14 January 1981

**Синопис.** На основании литературных данных было сделано предположение, что инфузории-седиментаторы (филтраторы) имеют три формы выбора пищи. Однако эксперименты с *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* показали, что они обладают только одной формой выбора. Эти инфузории находят скопления пищи среди скоплений непищевых частиц на основе положительного хемотаксиса к пище. Для *P. caudatum* аттрактантами являются уксусная, молочная и  $\alpha$ -кродоновая кислоты. Установлены основные причины ошибочных взглядов авторов, считавших, что инфузории-седиментаторы могут избирательно фагоцитировать пищу и избирательно выводить из цитоплазмы неперевариваемые вещества еще до того, как пища будет переварена. Обсуждается, как инфузории-седиментаторы осуществляют выбор пищи в природе.

Хорошо известно, что хищные простейшие способны выбирать пищу, то есть отличать пищевые (перевариваемые) объекты от непищевых (неперевариваемых) объектов (Seravin and Orlovskaja 1977). Однако литература о выборе пищи у инфузорий-филтраторов (активных седиментаторов)<sup>1</sup> весьма

<sup>1</sup> Присоединяясь к мнению Stockem, мы считаем более оправданным называть этих инфузорий седиментаторами, чем филтраторами, по следующим причинам. Во-первых, они не филтруют пищевые частицы из среды, а активно осаждают (седиментируют) частицы на дно глотки, где образуется пищевая вакуоль (Grębecki 1961, Meyer 1967, Sleigh and Barlow 1976). Во-вторых, эти инфузории флокулируют взвешенные в воде частицы и способствуют их более быстрой седиментации, благодаря чему играют важную роль в очистке воды (Curds 1973).



противоречива, хотя история этого вопроса насчитывает более 100 лет (Ehgenberg 1838).

Losina-Losinsky (1929) показал, что *Paramecium caudatum* скапливаются в суспензиях бактерий *Bacillus subtilis*, но не задерживаются в суспензиях *B. fluorescens* и *B. coli*, а также в суспензиях китайской туши и кармина. Безусловно, эти данные говорят о способности инфузорий отличать одни пищевые объекты от других пищевых и непищевых объектов. Вместе с тем, *P. caudatum*, как и другие седиментаторы, могут в больших количествах скапливаться и на непищевых частицах, таких как хинин, углекислый кальций, фильтровальная бумага и тому подобное (Losina-Losinsky 1929, Jennings 1931, Nakatani 1968).

Большинство исследователей считает, что инфузории-седиментаторы, в частности виды рода *Paramecium*, способны избирательно фагоцитировать пищу (Bragg 1939 a, b, Grittner 1951, Webb 1956, Fenchell 1968, Rapport et al. 1972, Fischer-Defoy 1977 et al.). Однако по мнению некоторых авторов (Jennings 1931, Gaevskaya 1949, Müller et al. 1965, Nakatani 1968, Ricketts 1971), эти простейшие не отличают пищевые частицы от непищевых, так как могут заглатывать наряду с пищей и неперевариваемые частицы (кармин, латекс, кварц и т. п.).

Существует мнение (Greenwood 1894, Metalnikov 1907, 1911, 1915, Lund 1914, Bishop 1923), что пищевые вакуоли с неперевариваемыми веществами выводятся из цитоплазмы седиментаторов задолго до того, как закончится переваривание пищи, находящейся в других вакуолях. Однако по данным Lubocka and Dembowski (1950), Kuźnicki and Sikora (1972), длительность циркулирования пищевых вакуолей в цитоплазме *Paramecium* зависит не от их содержимого, а в первую очередь от диаметра вакуолей.

Несмотря на противоречивость литературных данных, на основе имеющихся фактов все-таки можно предположить (Railkin and Seravin 1974), что у инфузорий-седиментаторов существует пищевая селекция в трех формах. Благодаря первичному выбору пищи, седиментаторы отличают скопления пищи от скоплений непищевых объектов и собираются в пищевой зоне. Первичный выбор может совершаться на территории, которая в десятки раз превышает размеры самой инфузории. Вторичный выбор пищи пространственно ограничен определенным районом ротового аппарата инфузории и заключается в избирательной фагоцитозе пищи из смеси пищевых и непищевых объектов, равномерно распределенных в среде. Избирательное выведение из цитоплазмы неперевариваемых веществ еще до того, как будет окончено переваривание пищи, можно условно также считать выбором пищи (третичным).

Основная задача данного исследования и заключается в проверке высказанного предположения, то есть выяснении того, как и на каких этапах пищевого поведения инфузории-седиментаторы осуществляют выбор пищи.



## Материал и методы

Инфузорий *Paramecium caudatum* клон М-116 и *Spirostomum ambiguum* (популяция) культивировали на бактериях *Aerobacter aerogenes* в салатной среде при температуре  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  по методу Sonneborn (1970).

Через 3–5 ч после кормления инфузорий отмывали от бактерий стерильной салатной средой<sup>2</sup> или минеральной средой Лозина-Лозинского, как описано в предыдущем сообщении (Railkin 1981) и оставляли голодать в течение 20–24 ч. Цитоплазма „голодных” инфузорий не содержала пищевых вакуолей с бактериями. „Сытых” простейших не отмывали от микроорганизмов, а брали в эксперимент через 1–3 ч после кормления.

В качестве пищевых частиц в экспериментах использовали штаммы стерильно культивировавшихся дрожжей *Candida guilliermondii* Н-П4, *Saccharomyces cerevisiae* 15В-П4, *S. elipsoideus*, бактерий *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* и одноклеточных водорослей *Chlorella* sp. № 106 и № 124. Непищевыми служили частицы янтаря, сефадекса G-25 Superfine (Uppsala, Sweden), активированного угля, синтетического алмаза и кармина. На основе метода двойного отмучивания (Sabanin 1907, Kachinsky 1965) выделяли фракции частиц определенных размеров.

В качестве непищевых токсичных частиц применяли специальным образом подготовленные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи в течение 1 часа фиксировали насыщенным раствором сулемы. Затем их промывали водой и протравливали в 5%-ном растворе железозаммиачных квасцов в течение 2 суток. После промывки водой дрожжи окрашивали 2%-ным раствором железного гематоксилина в течение суток и снова промывали водой. Затем дополнительно насыщали дрожжи сулемой, выдерживая их 30 мин в растворе фиксатора, и окончательно промывали салатной средой, разбавляя раствор в 100–1000 раз.

Все эксперименты по первичному выбору пищи выполнены при комнатной температуре  $19\text{--}22^\circ\text{C}$  с голодными инфузориями и повторены 5–10 раз. В центр чашки Петри (диаметр чашки 5 см) помещали небольшой комочек бактерий или дрожжей с таким расчетом, чтобы после прибавления 5 мл среды получить горку (скопление) микроорганизмов диаметром 6–8 мм. В экспериментах с *Paramecium* использовали минеральную среду, а в экспериментах со *Spirostomum* — салатную среду. На расстоянии 1–2 см от пищевого скопления помещали горку непищевых частиц диаметром 6–8 мм. На периферию микроаквариума выпускали 500–1000 *Paramecium* или 100–150 *Spirostomum*.

Через каждые 5 мин от начала эксперимента подсчитывали под микроскопом МБС-1 количество простейших, осевших на скопления пищевых и непищевых частиц. Процент реакции оседания рассчитывали как частное от деления числа инфузорий, осевших на скопление, к общему числу инфузорий в эксперименте.

Для исследования хемотаксиса *Paramecium* 20–40 мг активированного угля (размер частиц 5–25  $\mu\text{m}$ ) в течение 30–60 мин вымачивали в 1–2 мл раствора индивидуального химического вещества (аминокислоты, белка, липида и т. п.), приготовленного на минеральной среде. Затем частицы угля отмывали минеральной средой, разбавляя исходный раствор примерно в 100 раз. Частицы, адсорбировавшие то или иное вещество, помещали в виде горки диаметром 6–8 мм в центр микроаквариума, наполненного 1–2 мл минеральной среды. На периферию микроаквариума выпускали 100–200 *Paramecium* и наблюдали за их поведением.

Эксперименты по вторичному выбору пищи проводили в салатной среде при температуре  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  как с голодными, так и с сытыми инфузориями. Плотность культуры *Pa-*

<sup>2</sup> Здесь и в дальнейшем имеется в виду салатная среда с растворенным 1 : 20 фосфатным буфером Зёренсена ( $8.31 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.72 \text{ g K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  довести водой до 1000 ml).



*ramecium* составляла 500 клеток в 1 см<sup>3</sup>, а *Spirostomum* — 100 клеток в 1 см<sup>3</sup>. Концентрации пищевых и непищевых частиц определяли с помощью гемоцитометра. Распределение по размерам пищевых и непищевых частиц показано на Рисунке 1. В Таблице 1 даны некоторые физические характеристики непищевых частиц.

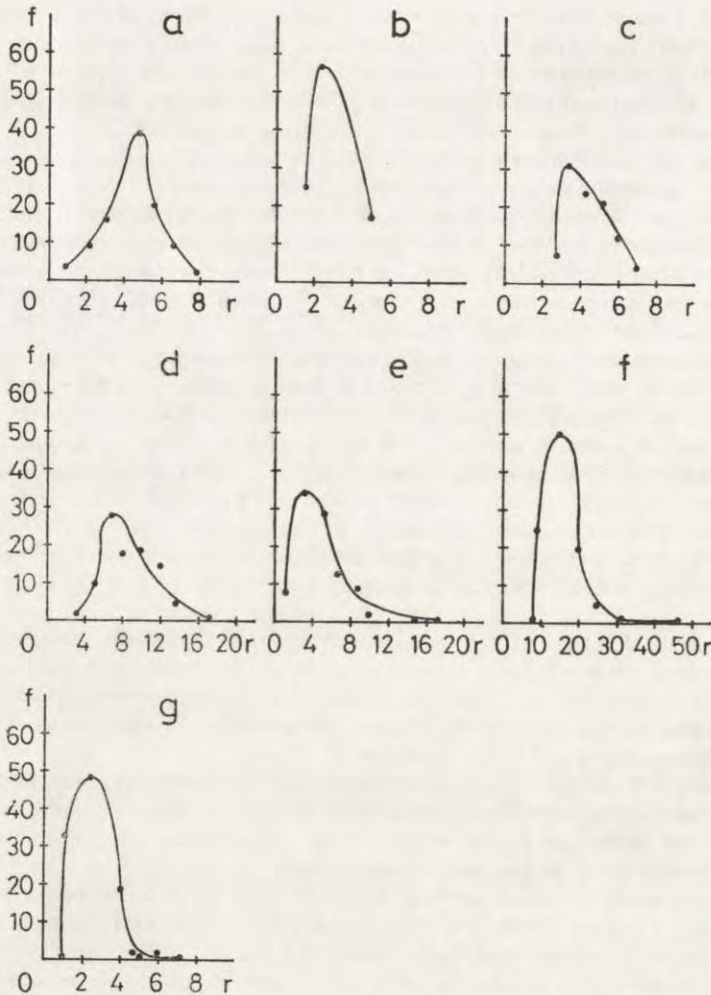


Рис. 1. Распределение по размерам пищевых и непищевых частиц. Абсцисса:  $r$  — размер частиц,  $\mu\text{m}$ ; Ордината:  $f$  — частота встречаемости частиц данного размера, %; а — *Saccharomyces ellipsoideus* (длина), б — *Saccharomyces ellipsoideus* (ширина), в — *Chlorella* sp., штамм № 124, д — *Chlorella* sp., штамм № 106, е — янтарь, ф — сефадекс, г — уголь

Fig. 1. Distribution of edible and inedible particles dimensions. Abscissa:  $r$  — dimension of particles in  $\mu\text{m}$ . Ordinate:  $f$  — frequency distribution of particle dimensions, %; а — *Saccharomyces ellipsoideus* (length), б — *Saccharomyces ellipsoideus* (width), в — *Chlorella* sp., strain No. 124, д — *Chlorella* sp., strain No. 106, е — amber, ф — sephadex, г — coal

Таблица 1

Table 1

Некоторые физические характеристики непищевых частиц  
 Certain physical characteristics of inedible particles

Название вещества Substance	Удельный вес (g/cm <sup>3</sup> ) Specific weight (g/cm <sup>3</sup> )	Средний размер частиц (μm) Mean dimension of particles (μm)	Минимальный и максимальный размер частиц (μm) Minimum and maximum dimension of particles (μm)	Примесь частиц других размеров (%%) Admixture of particles of other dimensions (%%)
Янтарь Amber	1.07	5.2±0.3	1–8	6
Сефадекс Sephadex	1.09	14.4±0.4	10–25	3
Уголь Coal	1.20–1.40	2.2±0.1	1–5	4
Алмаз Diamond	3.50–3.54		2–3, 3–5 5–7, 7–10	1

Для изучения вторичного выбора пищи в микроаквариуме смешивали равные объемы (обычно 0.4 см<sup>3</sup>) культуры инфузорий и смеси пищевых и непищевых частиц. В случае использования частиц алмаза, имеющего большой удельный вес, эксперименты проводили в стеклянных пробирках (внутренний диаметр 0.5–0.8 см, высота 4–5 см), герметично закрытых пробкой из инертного материала. Пробирки доверху наполняли смесью инфузорий и частиц. Один раз в минуту вертикально стоящую пробирку поворачивали на 180°. Расчеты показали, что в этом случае в течение всего эксперимента сохраняется равномерное распределение частиц алмаза и пищевых частиц по всему объему микроаквариума. Через 10 мин *Paramecium* фиксировали 0.25%-ным раствором формалина, а *Spirostomum* трижды с силой прогоняли через пипетку с тонким оплавленным концом. Контрольные эксперименты показали, что такое механическое раздражение полностью подавляет фагоцитоз *Spirostomum* на 30 мин. Кормление инфузорий смесью пищевых и токсичных частиц длилось не 10 мин, а полчаса, а объем микроаквариума был увеличен до 4 или 8 см<sup>3</sup>. При увеличении от 600 × до 1350 × подсчитывали число пищевых и непищевых частиц в 50 пищевых вакуолях.

В некоторых случаях, когда точный подсчет числа частиц угля, алмаза или дрожжей в пищевых вакуолях инфузорий вызывал затруднения, изготавливали контрольные микроскопические препараты. Инфузорий фиксировали жидкостью Буэна и переносили на предметное стекло. Обычно инфузории хорошо приклеиваются к стеклу, благодаря выстреливанию трихоцистов. После удаления избытка фиксатора препарат проводили через 2–3 смены 70° этанола до просветления препарата. На участок предметного стекла, содержащий приклеенных инфузорий, помещали покровное стекло. Проводя ногтем пальца по покровному стеклу, добивались расплющивания инфузорий и равномерного распределения пищевых и непищевых частиц по цитоплазме. Препарат (предметное или покровное стекло с приставшими к нему инфузориями) выдерживали 10–20 мин в 96° этаноле, после чего препарат окрашивали спиртовым раствором прочного зеленого и заключали в молочную кислоту.



Такие временные препараты сохранялись почти без выцветания 1–2 месяца. На них можно подсчитать общее число дрожжей, а также частиц угля (или алмаза) в цитоплазме инфузорий.

Когда в качестве непищевых частиц использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, зафиксированные сулемой и окрашенные железным гематоксилином, микроскопические препараты заключали не в молочную кислоту, а в терпениол. Последний, в отличие от молочной кислоты, сохраняет окраску токсичных частиц, однако при этом неокрашенные гематоксилином дрожжи (пищевые частицы) становятся трудно различимыми. Чтобы устранить этот недостаток препарата, поверх покровного стекла наносили каплю молочной кислоты, которую покрывали вторым покровным стеклом. Получалась своего рода оптическая линза, позволяющая различать неокрашенные дрожжи.

Для оценки степени пищевой селективности инфузорий сопоставляли соотношение между числом пищевых и непищевых частиц в микроаквариуме и в пищевых вакуолях инфузорий. Полученные эмпирические ряды распределений сравнивали по критерию  $\chi^2$  и  $t_{st}$  (критерию Стьюдента).

Эксперименты по третичному выбору пищи были выполнены в салатной среде при комнатной температуре. *Paramecium* кормили дрожжами *Saccharomyces ellipsoideus*, смешанными с частицами кармина (2–10  $\mu\text{m}$ ) в отношении 1 : 1, а *Spirostomum* кормили дрожжами *Candida guilliermondii*, смешанными с кармином в той же пропорции при суммарной концентрации частиц  $2 \times 10^5/\text{cm}^3$ . После того как инфузории образовывали определенное число пищевых вакуолей с дрожжами и кармином, их отмывали стерильной салатной средой. Затем инфузорий помещали в суспензию частиц алмаза, также имеющих концентрацию  $2 \times 10^5/\text{cm}^3$ . Когда простейшие образовывали определенное число пищевых вакуолей с алмазом, их окончательно отмывали от частиц и помещали во влажные камеры. Наблюдения показали, что во всех пищевых вакуолях, содержащих алмаз, отсутствуют пищевые частицы, а во всех вакуолях с кармином имеются дрожжи. Общее количество пищевых вакуолей в цитоплазме инфузорий было равно 4–6. В контрольных экспериментах было установлено, что кармин не влияет на длительность циркулирования пищевых вакуолей с дрожжами. У *Paramecium* средний диаметр пищевых вакуолей с дрожжами и кармином составлял  $11.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , а вакуолей с алмазом (7–10  $\mu\text{m}$ ) —  $12.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ; у *Spirostomum* средний диаметр пищевых вакуолей с дрожжами и кармином был равен  $15.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ , а вакуолей с алмазом (5–7  $\mu\text{m}$ ) —  $14.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ . Непосредственно на движущихся инфузориях при увеличении  $34 \times$  подсчитывали число пищеварительных вакуолей с кармином и с алмазом через каждые 15 мин у *Paramecium* и через 60 мин у *Spirostomum*. Всего прослеживали судьбу не менее 50–100 вакуолей. На основании полученных данных рассчитывали среднее время циркулирования вакуолей в цитоплазме. Статистическую обработку проводили с использованием критерия  $\chi^2$ .

## Результаты

Если в микроаквариум, наполненный 1–2 ml минеральной среды Лозина-Лозинского, поместить 100–200 *Paramecium*, то в течение многих часов инфузории остаются равномерно распределенными в среде или, что чаще, двигаются по периферии сосуда. Траектория их движения имеет, как правило, форму вытянутой спирали, закрученной влево, если смотреть по ходу движения.

Сходным оказывается поведение *Paramecium* и в микроаквариуме, на дне которого находится горка (скопление) непищевых частиц (уголь, бентонит,



сефадекс, кармин, китайская тушь). Многократные опыты отчетливо показали, что инфузории не привлекаются на расстоянии к скоплению непищевых частиц. Лишь в первые 10–15 мин эксперимента некоторые из простейших, случайно проплывающих над скоплением, оседают на непищевые частицы, но обычно не дальше, чем на 10 сек. В дальнейшем в течение многих часов инфузории вообще не опускаются на эти частицы и остаются равномерно распределенными в среде.

Принципиально иное поведение *Paramecium* проявляют по отношению к скоплению бактерий или дрожжей. Уже на расстоянии 300–500  $\mu\text{m}$  от горки пищевых частиц горизонтально плывущая *Paramecium* нередко изменяет направление своего движения почти на  $90^\circ$  и как бы „ныряет” в гущу микроорганизмов. Вслед за оседанием на пищевое скопление инфузория прикрепляется передним концом тела к субстрату среди бактерий или дрожжей (обычно в вертикальном положении) и начинает интенсивно питаться. Простейшие остаются на горке микроорганизмов в течение многих часов и даже суток.

Исследование динамики реакции оседания показало, что более 75% *Paramecium* оседают на скопления бактерий и дрожжей в первые 5–10 мин от начала эксперимента, а оптимальное время для их оседания составляет 15 мин.

Если на периферию микроаквариума, в центре которого находится горка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выпустить всего одну *Paramecium*, то она вначале, как правило, двигается вдоль края микроводоема, а затем с расстояния до 5–7  $\text{mm}$  кратчайшим путем направляется к скоплению дрожжей. Достигнув пищевой горки, инфузория оседает на нее и вскоре прикрепляется к субстрату. В 20 экспериментах оседание на скопление дрожжей наблюдалось в среднем через  $95 \pm 25$  сек с момента помещения инфузорий в микроаквариум. Таким образом, *Paramecium*, по-видимому, проявляют положительный хемотаксис к скоплению микроорганизмов.

Естественно предположить, что *Paramecium* привлекаются к скоплению бактерий и дрожжей какими-то химическими веществами, выделяемыми микроорганизмами. По-видимому, можно вызвать положительный хемотаксис инфузорий даже к непищевым частицам, если создать вокруг них „запах” пищи. Для этой цели удобно использовать активированный уголь, так как он является полифункциональным адсорбентом, задерживая на своей поверхности как аполярные, так и полярные соединения различной природы (Ermolenko et al. 1937, Kiselev 1957, Vlasova et al. 1962, Shinoda et al. 1966, Dubinin et al. 1973).

Известно, что бактерии и дрожжи могут выделять в культуральную среду аминокислоты, ферменты, полисахариды, липиды, антибиотики, витамины, органические кислоты и спирты (Shaposhnikov et al. 1964, Tretjakova et al. 1971, Gracheva and Gavrilova 1972, Gogoleva et al. 1973, Yurkevich and Naumova 1973, Nefelova et al. 1974, Zalashko and Pidoplichko 1974, Narayanan and Rao et al. 1976). Испытание 65 индивидуальных веществ,



относящихся к этим классам соединений, показало, что аттрактантами для *Paramecium* являются некоторые органические кислоты: уксусная, молочная и  $\alpha$ -кетоновая. Так, на горку угля, частицы которого адсорбировали уксусную кислоту из 0.1% раствора среди непищевых частиц в опытах с массовой культурой в течение 10 мин оседают и прикрепляются к субстрату 100% инфузорий. В 30 экспериментах с единичными инфузориями (1–10 клеток в 1–2 ml среды) при аналогичных условиях 100% реакция оседания наблюдалась в среднем уже через  $97 \pm 56$  сек. Следует отметить, что реакция инфузорий по отношению к горке угля, частицы которого пропитаны раствором аттрактанта, не зависела от pH среды в пределах от 5.0 до 7.0. Остальные 12 испытанных органических кислот (муравьиная, пропионовая, гликолевая, пировиноградная, глюконовая, янтарная, яблочная,  $\alpha$ -кетоглутаровая, лимонная, фумаровая, щавелевая,  $\gamma$ -аминомасляная) не привлекают *Paramecium* при использовании данной методики.

Как поведут себя инфузории в среде, где одновременно будут находиться два скопления: одно пищевое, а другое — непищевое? Чтобы выяснить это, на дно чашки Петри на расстоянии 1–2 см друг от друга поместили горку дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и горку частиц китайской туши, а затем выпустили *Paramecium* на периферию микроаквариума. С первых минут эксперимента инфузории проявляют положительный хемотаксис к скоплению дрожжей, оседают среди них, прикрепляются к субстрату и начинают интенсивно питаться. Уже через 15 мин от начала эксперимента практически все инфузории, помещенные в микроаквариум, оказываются прикрепленными среди дрожжевых клеток. В то же время на непищевых частицах они вообще не задерживаются.

Сходным образом на основе положительного хемотаксиса *Paramecium* отличают скопление *Proteus vulgaris* от скопления частиц бентонита. Эти инфузории могут также в какой-то степени отличать одно пищевое скопление от другого. Так, если в среде с *Paramecium* находятся горка дрожжей *Candida guilliermondii* и одновременно с ней горка бактерий *Proteus vulgaris*, то большая часть инфузорий оседает среди дрожжей.

*Spirostomum* также проявляют определенную пищевую селективность, посредством которой они отличают скопление бактерий *Aerobacter aerogenes* или дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* от скопления частиц угля. Через час после начала опыта среди непищевых частиц находится в среднем всего одна инфузория. В то же время среди микроорганизмов оказываются прикрепленными в горизонтальном положении более 50% простейших, а остальные группируются вокруг пищевой горки. Аттрактантами для *Spirostomum* являются пока не идентифицированные низкомолекулярные вещества, выделяемые бактериями и другими микроорганизмами.

Таким образом, *Paramecium* и *Spirostomum* обладают первичным выбором пищи, благодаря которому они отличают скопления пищевых объектов от



скоплений непищевых объектов на основании положительного хемотаксиса.

На наш взгляд, при исследовании способности инфузорий выбирать пищевые частицы из смеси пищевых и непищевых частиц (вторичный выбор пищи) необходимо создать равноценные условия для фагоцитоза инфузориями как пищевых, так и непищевых частиц. В связи с этим предельные размеры любых использованных частиц не превышали  $5 \mu\text{m}$  для *Paramecium* и  $7 \mu\text{m}$  для *Spirostomum*. В предыдущем сообщении (Railkin 1981) было показано, что размер частиц в указанных пределах не влияет на фагоцитоз этих инфузорий. Все более крупные частицы попадают в пищевые вакуоли в количествах тем меньших, чем крупнее эти частицы.

В первой серии экспериментов исследовали, как инфузории выбирают пищу из смеси дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus* ( $2.6 \pm 0.1 \mu\text{m} \times 4.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) и частиц угля ( $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ). Суммарная концентрация пищевых и непищевых частиц в микроаквариумах с *Paramecium* составляла  $2 \times 10^5/\text{cm}^3$ , со *Spirostomum* —  $4 \times 10^4/\text{cm}^3$ . Таким образом, на каждого *Paramecium* приходилось в среднем 2000 частиц, а на каждого *Spirostomum* — 400 частиц. Было установлено, что при таких условиях инфузории не проявляют пищевой селективности (Табл. 2). Из смеси равных количеств клеток дрожжей и частиц угля *Paramecium* и *Spirostomum* поглощают примерно поровну пищевых и непищевых частиц. Если в смеси в 4 раза больше клеток дрожжей, то инфузории заглатывают приблизительно в 4 раза больше дрожжей, чем частиц угля. При обратном соотношении пищевых и непищевых частей наблюдается противоположная ситуация.

При кормлении одними пищевыми частицами в течение 10 мин *Paramecium* образуют  $16.22 \pm 0.48$  пищевых вакуолей с дрожжами, а *Spirostomum* —  $8.19 \pm 0.20$  вакуолей. При кормлении углем за то же время *Paramecium* образуют  $9.26 \pm 0.25$  вакуолей, а *Spirostomum* соответственно  $3.83 \pm 0.10$  вакуолей.

Считается, что сытые инфузории-седиментаторы лучше отличают пищевые объекты от непищевых (Schaeffer 1910, Metalnikov 1911, 1914, Lund 1914, Izumov 1948). Однако наши эксперименты показали, что сытые инфузории, так же как и голодные фагоцитируют дрожжи и уголь в той пропорции, в какой эти пищевые и непищевые частицы находятся в среде (Табл. 2).

Статистическая обработка полученных данных не подтвердила рабочей гипотезы о существовании у инфузорий-седиментаторов вторичного выбора пищи ( $\chi^2_{\phi} \ll \chi^2_{95}$ ).

С использованием контрольных микроскопических препаратов было, в частности установлено, что из равномерной взвеси дрожжей и угля, смешанных 1 : 4, сытые *Paramecium* за 10 мин заглатывают в среднем  $53 \pm 3$  дрожжевых клетки и  $207 \pm 8$  частиц угля. Очевидно, и в этом случае выбор пищи отсутствует ( $\chi^2_{\phi} = 5.9 \ll \chi^2_{95} = 22.4$ ).

Может быть, частицы угля адсорбировали химические вещества, выде-



Таблица 2

Table 2

Фагоцитоз смеси дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus* и частиц угля *Parametium caudatum* и *Spirostomium ambiguum*  
 Phagocytosis of *Parametium caudatum* and *Spirostomium ambiguum* in the mixture of *Saccharomyces ellipsoideus* cells and coal particles

Соотношение дрожжи: уголь в среде с инфузориями Relation between yeast cells and coal particles in medium with ciliates	<i>Parametium caudatum</i>		<i>Spirostomium ambiguum</i>	
	Среднее число частиц в одной пищевой вакуоли Mean number of particles inside one food vacuole		Среднее число частиц в одной пищевой вакуоли Mean number of particles inside one food vacuole	
	дрожжи yeasts	уголь coal	дрожжи yeasts	уголь coal
	$\chi^2_{\Phi}$	$\chi^2_{95}$	$\chi^2_{\Phi}$	$\chi^2_{95}$
1 : 4	1.30±0.21	5.32±0.31	13.9	37.7
1 : 1	4.74±0.29	4.78±0.33	15.8	42.6
4 : 1	7.18±0.43	1.82±0.19	10.4	42.6
			Голодные инфузории Starved ciliates	
			1.98±0.15	6.98±0.15
			4.14±0.24	3.82±0.24
			5.82±0.67	1.62±0.24
			Сытые инфузории Not starved ciliates	
			1.62±0.18	5.98±0.47
			1.50±0.19	1.62±0.22
			5.32±0.54	1.47±0.22
1 : 4	1.18±0.14	4.62±0.32	5.4	35.2
1 : 1	4.20±0.39	4.40±0.40	21.0	40.1
4 : 1	4.78±0.39	1.32±0.18	7.9	40.1
			1.62±0.18	13.0
			1.50±0.19	16.1
			5.32±0.54	18.8
			6.98±0.15	42.6
			3.82±0.24	30.1
			1.62±0.24	49.8

ляемые дрожжами, и поэтому простейшие не отличили пищевые частицы от непищевых? Были поставлены контрольные опыты, в которых вместо угля применяли частицы янтаря ( $5.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ), который является очень слабым адсорбентом. В расчете на одну пищевую вакуоль голодные *Spirostomum* в этом случае фагоцитируют по  $3.56 \pm 0.34$  клеток дрожжей и  $3.50 \pm 0.38$  частиц янтаря ( $\chi^2_{\Phi} = 9.9 \ll \chi^2_{95} = 47.4$ ), а сытые *Spirostomum* заглатывают по  $2.62 \pm 0.23$  клеток дрожжей и  $2.76 \pm 0.25$  частиц янтаря ( $\chi^2_{\Phi} = 8.6 \ll \chi^2_{95} = 35.2$ ), что подтверждает отсутствие избирательности.

Не исключено, что уменьшение общего числа частиц в среде с простейшими может создать более благоприятные условия для выбора пищи. Поэтому во второй серии экспериментов седиментаторов кормили смесью водорослей *Chlorella* sp. № 124 ( $4.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) и частиц угля ( $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ), когда на каждую инфузорию приходилось в среднем только 16 пищевых и непищевых частиц. Было установлено, что и в этом случае ни голодные, ни сытые инфузории не проявляют пищевой селективности (Табл. 3), хотя пищевые частицы по-прежнему стимулируют фагоцитоз. В течение 10 мин *Paramecium* образуют  $2.28 \pm 0.18$  пищевых вакуолей с углем и  $4.98 \pm 0.30$  вакуолей с водорослями, а *Spirostomum* соответственно  $0.74 \pm 0.08$  и  $2.40 \pm 0.12$  вакуолей. В контрольных опытах в смеси с *Chlorella* использовали частицы алмаза ( $2-3 \mu\text{m}$ ), являющегося слабым адсорбентом. Добивались равномерного распределения легких пищевых частиц и тяжелых непищевых частиц в среде с инфузориями в ходе всего эксперимента (см. Материал и методы). В расчете на одну пищевую вакуоль голодные *Paramecium* заглатывают  $0.75 \pm 0.05$  клеток водорослей и  $0.70 \pm 0.07$  частиц алмаза ( $\chi^2_{\Phi} = 6.4 \ll \chi^2_{95} = 19.7$ ), а сытые инфузории поглощают  $0.63 \pm 0.05$  клеток водорослей и  $0.70 \pm 0.07$  частиц алмаза ( $\chi^2_{\Phi} = 1.23 \ll \chi^2_{95} = 7.8$ ).

Таким образом, ни *Paramecium*, ни *Spirostomum* не выбирали пищу из взвеси пищевых и инертных непищевых частиц, равномерно распределенных в среде.

Интересно было бы выяснить, смогут ли инфузории избирательно питаться живыми дрожжами, смешанными с токсичными частицами в равной пропорции, то есть тогда, когда химические различия между пищевыми и непищевыми частицами наиболее сильно выражены. В качестве токсичных частиц были взяты мертвые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, зафиксированные сулемой и окрашенные железным гематоксилином. Суммарная концентрация частиц во всех случаях составляла  $1 \times 10^6$  частиц в  $\text{cm}^3$ . Контрольные опыты показали, что при питании смесью живых и мертвых дрожжей *Paramecium* образовывали за 10 мин  $5.90 \pm 0.15$  пищевых вакуолей, а *Spirostomum* — соответственно  $3.94 \pm 0.14$  вакуолей. Заглатывая токсичные частицы, *Paramecium* гибли через 1–2 часа, а *Spirostomum* через 4–5 часов. Если отделить среду от токсичных частиц, то в ней инфузории остаются живыми, по крайней мере, сутки. Следовательно, ядовитыми являются сами дрожжи, а не среда, в которой они находятся.





Из смеси живых и насыщенных сулемой дрожжей инфузории поглощали как пищевые, так и отравленные ядом дрожжи. На контрольных микроскопических препаратах в пищевых вакуолях *Paramecium* находилось в среднем  $5.92 \pm 0.31$  съедобных и  $5.80 \pm 0.40$  токсичных дрожжей. Сравнение с помощью критерия  $\chi^2$  эмпирических рядов распределения частоты встречаемости данного числа пищевых и токсичных клеток в вакуолях не выявило статистически достоверных различий между ними ( $\chi^2_{\phi} = 7.7 \ll \chi^2_{95} = 15.5$ ). Аналогичные результаты были получены и для *Spirostomum*. В пищевых вакуолях этого простейшего было заключено в среднем по  $7.08 \pm 0.42$  пищевых и  $6.94 \pm 0.41$  токсичных дрожжевых клеток ( $\chi^2_{\phi} = 12.5 < \chi^2_{95} = 19.7$ ).

Таким образом, ни *Paramecium*, ни *Spirostomum* не способны, очевидно, выбирать пищу из равномерной взвеси пищевых и токсичных частиц.

Каковы возможные причины несоответствия между полученными нами результатами и литературными данными? Специальные эксперименты показали, что если выполнять опыты по вторичному выбору пищи при неопре-

Таблица 4

Table 4

Фагоцитоз смеси пищевых и непищевых частиц, резко различающихся по размеру или удельному весу

Phagocytosis of *Paramecium caudatum* and *Spirostomum ambiguum* in the mixture of edible and inedible particles of different dimensions and specific weight

Сочетание пищевых и непищевых частиц в смеси Combinations between edible and inedible particles in the mixture	Среднее число частиц в одной пищевой вакуоли Mean number of particles inside one food vacuole			
	<i>Paramecium caudatum</i>	$t_d$	<i>Spirostomum ambiguum</i>	$t_d$
<i>Chlorella</i> sp. (штамм № 124) (strain No. 124) сефадекс sephadex	$1.32 \pm 0.10$ $0.08 \pm 0.01$	12.4	$1.48 \pm 0.07$ $0.10 \pm 0.01$	19.5
<i>Chlorella</i> sp. (штамм № 124) (strain No. 124) алмаз diamond	$0.78 \pm 0.08$ $0.52 \pm 0.03$	3.0	$0.66 \pm 0.10$ $3.16 \pm 0.26$	10.4
<i>Chlorella</i> sp. (штамм № 106) (strain No. 106) уголь coal	$0.52 \pm 0.03$ $0.74 \pm 0.08$	2.6	$0.36 \pm 0.03$ $0.90 \pm 0.09$	11.0



деленных и неравноценных условиях для фагоцитоза инфузориями пищевых и непищевых частиц (как это делало большинство авторов), можно получить противоречивые результаты.

Так, из суспензии дрожжей и кармина, смешанных в неопределенных соотношениях, *Paramecium* в одних случаях заглатывают больше дрожжей, в других — больше кармина и лишь изредка фагоцитируют их примерно поровну.

В остальных экспериментах применяли пищевые и непищевые частицы, резко различающиеся по размеру или удельному весу, но имеющие одинаковые концентрации ( $1.6 \times 10^3/\text{cm}^3$  в случае *Spirostomum* и  $8 \times 10^3/\text{cm}^3$  в случае *Paramecium*). Полученные результаты представлены в Табл. 4.

Из смеси мелких водорослей *Chlorella* sp. № 124 ( $4.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) и крупных шариков сефадекса ( $14.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ) инфузории фагоцитируют преимущественно пищу. Напротив, из смеси мелких частиц угля ( $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) и крупных водорослей *Chlorella* sp. № 106 ( $8.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) седиментаторы „выбирают” непищевые частицы. Результаты этих экспериментов объясняются тем, что цитостом инфузорий-седиментаторов является самой узкой частью ротового аппарата и имеет ограниченный диаметр. Поэтому фагоцитоз частиц, размеры которых превышают диаметр цитостома, затруднен по сравнению с фагоцитозом более мелких частиц (Railkin 1981).

Если в качестве непищевых использовать тяжелые частицы алмаза величиной 2–3 или 3–5  $\mu\text{m}$  и не осуществлять перемешивания среды, то из смеси *Chlorella* sp. № 124 и алмаза *Paramecium*, находящиеся в опыте в верхней части сосуда, „избирательно” фагоцитируют мелкие клетки водорослей, а *Spirostomum*, плавающие у дна, „выбирают” частицы алмаза. Совершенно очевидно, что по мере протекания эксперимента соотношение между числом пищевых и непищевых частиц возрастает в верхней части микроаквариума и уменьшается в нижней части, так как тяжелые частицы алмаза оседают быстрее легких водорослей. Именно этим, а не избирательным характером фагоцитоза, объясняется тот факт, что в данном случае *Paramecium* заглатывают больше пищевых частиц, а *Spirostomum* — больше непищевых частиц.

Эксперименты по третичному выбору пищи показали, что длительность циркулирования в цитоплазме *Spirostomum* пищеварительных вакуолей с дрожжами *Candida guilliermondii* и вакуолей с частицами алмаза (5–7  $\mu\text{m}$ ) статистически одинакова и не зависит от порядка кормления инфузорий дрожжами и алмазами, а также от физиологического состояния инфузорий (Табл. 5). Было установлено также, что относительное количество пищеварительных вакуолей с дрожжами и с алмазами, находящихся в цитоплазме инфузорий, не влияет на длительность циркулирования вакуолей с этими веществами (Табл. 5)<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Следует подчеркнуть, что такие результаты получаются только тогда, когда пищевые вакуоли с пищей и с непищевыми частицами имеют одинаковый диаметр (см. Материал и методы).



Таблица 5

Table 5

Длительность циркулирования в цитоплазме *Spirostomum ambiguum* пищевых вакуолей с дрожжами *Candida guilliermondii* и с алмазами

Duration of cyclosis of *Spirostomum ambiguum* food vacuoles filled with yeasts *Candida guilliermondii* cells and diamond particles

Физиологическое состояние инфузорий Physiological state of ciliates	Порядок кормления инфузорий Feeding	Соотношение числа пищевых вакуолей с дрожжами: пищевых вакуолей с алмазами в цитоплазме Relation between the number of food vacuoles filled with yeast cells and the number of vacuoles filled with diamond particles in cytoplasm of the ciliates	Среднее время циркулирования пищевых вакуолей в часах Mean time of food vacuole cyclosis in hours		$\chi^2_{\Phi}$	$\chi^2_{95}$
			с дрожжами with yeast cells	с алмазами with diamond particles		
голодные starved	прямой <sup>1</sup> direct	1:1	5.3±0.1	5.3±0.1	1.8	9.5
голодные starved	обратный <sup>1</sup> reversed	1:1	5.6±0.2	5.8±0.2	5.0	11.1
сытые not starved	прямой direct	1:1	5.6±0.2	5.2±0.2	8.5	11.1
голодные starved	прямой direct	1:3	4.8±0.1	4.7±0.1	4.2	7.8
голодные starved	прямой direct	3:1	5.6±0.1	5.7±0.1	7.5	12.6

<sup>1</sup> При прямом порядке кормления инфузорий кормили сначала смесью дрожжей и кармина, а после отмытки частицами алмаза. Прямопротивоположный порядок кормления назван обратным.

In „direct” feeding the ciliates were fed with the mixture of yeasts cells and carmine particles and, after rinsing, with diamond particles. The opposite to direct has been called „reversed” procedure.

Чтобы изучить способность *Paramecium* к третичному выбору пищи, провели в общей сложности 25 экспериментов, в которых варьировали порядок кормления инфузорий алмазами и дрожжами *Saccharomyces ellipsoideus*. Начальное соотношение между пищевыми вакуолями с алмазом и дрожжами примерно в половине случаев составляло 1 : 1. Средняя продолжительность циркулирования пищеварительных вакуолей с дрожжами была равна 65.0±3.6 мин, а вакуолей с алмазом — 75.3±6.1 мин ( $\chi^2_{\Phi} = 6.3 \ll \chi^2_{95} = 15.5$ ). Таким образом, *Paramecium* и *Spirostomum*, вероятно, не обладают третичным выбором пищи.



## Обсуждение

Полученные экспериментальные данные доказывают, что инфузории-седиментаторы *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum*, относящиеся к двум различным классам ресничных инфузорий (Corliss 1979), обладают хорошо развитой пищевой селективностью. Осуществляя первичный выбор пищи, они отличают скопления пищевых объектов от скоплений непищевых объектов, а также отличают скопления бактерий от скоплений дрожжей. На основе положительного хемотаксиса инфузории скапливаются среди микроорганизмов, оседают, а затем и прикрепляются к субстрату и начинают интенсивно питаться. Весьма вероятно, что прикрепление инфузорий к субстрату осуществляется благодаря „заякоривающему” действию трихоцист (Jones and Cloyd 1950).

В наших экспериментах *Paramecium* держались на скоплениях микроорганизмов в течение многих часов, а на скопления непищевых частиц оседали единичные особи, причем не более, чем на 10 сек. Временное оседание инфузорий на непищевые частицы, очевидно, было обусловлено тигмотаксисом (Dembowski 1945).

Длительный контакт *Paramecium* с непищевыми частицами, наблюдавшийся рядом авторов (Losina-Losinsky 1929, Jennings 1931, Nakatani 1968), мог быть связан с присутствием на этих частицах микроорганизмов, привлекающих инфузорий, так как указанные исследователи проводили эксперименты в культуральной среде, богатой бактериями. Известно (Sorokin 1974), что попадая на органические и минеральные частицы, микроорганизмы нередко задерживаются на них.

Различия в скорости оседания *Paramecium* на скопления дрожжей в опытах с массовой культурой и в экспериментах с единичными особями объясняются, на наш взгляд, следующими причинами. Когда в небольшом объеме (1–2 ml) жидкости двигаются одновременно 100–200 инфузорий, они, очевидно, в какой-то мере перемешивают среду и нарушают химический градиент, существующий вокруг пищевого скопления. Поэтому инфузории прямолинейно двигаются по линиям градиента лишь в непосредственной близости от дрожжей (с расстояния до 500  $\mu\text{m}$ ). Напротив, если в микроаквариуме такого же объема находится всего одна инфузория, то она не нарушает химический градиент и направленно двигается к скоплению дрожжей с расстояния 5–7 mm, что почти в 30 раз превышает длину ее тела.

Из испытанных органических кислот аттрактантами для *Paramecium* оказались только уксусная, молочная и  $\alpha$ -кетоновая кислоты. Эти данные подтверждают взгляды Jennings (1931) и Nakatani (1968) о том, что хемотактическая реакция инфузорий определяется прежде всего специфической природой аттрактанта. Можно предположить, что эти или подобные им органические кислоты являются естественными аттрактантами *Paramecium cauda-*



*tum*, так как многие виды бактерий и дрожжей способны выделять во внешнюю среду уксусную, молочную и другие кислоты (Loysjanskaja et al. 1965, Tretyakova et al. 1971, Finogenova et al. 1973).

По-видимому, не только *Paramecium* и *Spirostomum*, но и другие инфузорииседиментаторы могут осуществлять первичный выбор пищи, так как положительный хемотаксис, лежащий в его основе, описан у всех изученных в этом отношении инфузорий. Многие авторы считают, что инфузорииседиментаторы способны выбирать пищу из смеси пищевых и непищевых частиц, то есть осуществлять вторичный выбор пищи (Greenwood 1894, Metalnikov 1907, 1911, 1914, Schaeffer 1910, Lund 1914, Losina-Losinsky 1923, 1929, Bozler 1924, Bragg 1936, Smith 1937, Kidder and Stuart 1939, Izumov 1948, Grittner 1951, Gutierrez 1958, Dive 1972, Rapport et al. 1972, Fischer-Defoy 1977). Однако в наших экспериментах *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* фагоцитировали пищевые и непищевые частицы в той пропорции, в какой эти частицы находились в среде с инфузориями (при условии равномерного распределения частиц в среде). Ricketts (1971) также показал, что у *Tetrahymena pyriformis* отсутствует избирательный фагоцитоз.

Каковы причины противоречий наших данных с литературными? По-видимому основная причина заключается в том, что в большинстве исследований по вторичному выбору отсутствует достаточно строгий количественный подход к анализу явления пищевой селекции. Многие авторы не приводят вообще никаких количественных данных о способности седиментаторов выбирать пищу. В некоторых случаях (Schaeffer 1910, Rapport et al. 1972) используются недостаточно обоснованные критерии оценки пищевой селекции, во многих случаях отсутствует статистическая обработка результатов экспериментов.

Помимо этого исследователи допускают и чисто методические ошибки. Так, нами показано, что если не учитывать пропорцию пищевых и непищевых частиц в среде с инфузориями, а ее за редкими исключениями обычно не учитывают, то можно прийти к противоречивым результатам.

Диаметр цитостома — самой узкой части ротового аппарата инфузорий — определяет наибольший размер частиц, которые могут фагоцитироваться инфузориями-седиментаторами с максимальной частотой (Railkin 1981). Поэтому в экспериментах по выбору пищи следует учитывать относительные размеры пищевых и непищевых частиц, что также обычно не принимается во внимание. Наконец, если не обеспечить равномерное распределение пищевых и непищевых частиц в среде с инфузориями, то также можно получить противоречивые результаты. Это связано с тем обстоятельством, что количество частиц данного типа, заглоченных инфузорией, зависит от локальной концентрации данных частиц в том микрообъеме, который облавливает инфузория (Railkin 1981).



Можно предположить, что не только *P. caudatum* и *S. ambiguum*, исследованные нами, но и другие инфузории, являющиеся активными седиментаторами, не обладают избирательным фагоцитозом, так как все они имеют принципиально одинаковый способ питания.

Изучение способности инфузорий к третичному выбору пищи показало, что в случае равенства размеров пищеварительных вакуолей с пищевыми и с непищевыми веществами длительности циркулирования этих вакуолей в цитоплазме *Paramecium* и *Spirostomum* достоверно не различаются. По нашим наблюдениям, которые подтверждаются литературными данными (Kuźnicki and Sikora 1972), чем больше величина пищеварительных вакуолей, тем меньше скорость их движения. Вероятно, избирательное выведение пищеварительных вакуолей с непищевыми веществами из цитоплазмы, отмеченное рядом авторов (Greenwood 1894, Metalnikov 1911, Lund 1914, Bishop 1923), было обусловлено тем, что вакуоли с пищей имели больший диаметр, чем вакуоли с непищевыми веществами. Совершенно очевидно, что тем были созданы неравноценные условия для движения пищеварительных вакуолей с пищевыми и непищевыми веществами. По данным Nilsson (1979), темп дефекации *Tetrahymena pyriformis* не зависит от того, какие вещества — инертные или перевариваемые — были заглочены. Основываясь на идее общности механизмов циклоза у инфузорий (Jahn and Vovee 1969), можно предположить, что не только *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum*, но и другие инфузории-седиментаторы не обладают третичным выбором пищи.

Таким образом, в результате экспериментальной проверки предположения о трехэтапности выбора пищи у инфузорий удалось установить, что инфузории-седиментаторы, как и другие простейшие, способны к пищевой селективности, но только в форме первичного выбора пищи, основанного главным образом на хеморецепции.

Означает ли все сказанное, что в природе инфузории-седиментаторы едят все подряд? Разумеется, нет. Как и хищные простейшие, они могут специализироваться на сравнительно узком круге пищевых объектов (Fauré-Fremiet 1950, Stout 1956, Webb 1956, Taylor and Berger 1976). Так, представители семейств *Metopidae* и *Caenomorphidae* в естественных условиях питаются только серными бактериями (Fenchel 1968). Однако подобная пищевая специализация, надо думать, относительна. Во всяком случае, хищных простейших в эксперименте удается переучивать с одного вида пищи на другой (Berger 1977, Orlovskaja et al. 1978). Вопрос о способности седиментаторов научиться выбирать пищу до сих пор остается открытым (Seravin 1978).

Попытаемся представить себе, как инфузории-седиментаторы выбирают пищу в природе. Распределение этих простейших в естественных водоемах, в первую очередь, связано с характером распределения бактерий и одноклеточных водорослей, служащих им пищей (Noland 1925, Webb 1956, Mordukhaj-Boltovskaja 1965).



По мнению Webb (1956), образованию группировки инфузорий предшествует накопление поверхностно-активных веществ (органических кислот, аминокислот, белков, липопротеинов и т. п.) на границе раздела двух фаз (вода-грунт или вода-воздух). В результате образуются органические пленки, на которых как на пищевом субстрате начинают собираться микроорганизмы. Известно, что аттрактантами для бактерий являются определенные аминокислоты и углеводы (Adler 1972, Seymour and Doetsch 1973). Интенсивное размножение бактерий или водорослей приводит к образованию пищевых скоплений, вокруг которых создается пищевой запах. Инфузории-седиментаторы хемотактически привлекаются к скоплению микроорганизмов, оседают среди них и начинают питаться. Так на основе положительного хемотаксиса седиментаторы выбирают пищу в природе.

Из сказанного становится понятным, что пищевая специализация этих простейших должна быть обусловлена, в первую очередь, способностью инфузорий находить локальные скопления вполне определенных видов микроорганизмов, которые в течение длительного времени смогут поддерживать рост протозойной популяции.

В какой мере в природе осуществляются условия для вторичного и третичного выбора пищи — наличие как пищевых, так и непищевых частиц в воде и их равномерное распределение? Известно, что бактерии, водоросли, простейшие и другие организмы, населяющие водоемы, выделяют во внешнюю среду различные слизистые вещества (mucous substances), которые вызывают слипание пищевых и непищевых частиц, взвешенных в воде, в крупные агрегаты (Ray 1951, Jahn et al. 1965, Kroes 1972, Zevenhuizen and Ebbink 1974). При этом общая концентрация взвешенных в воде частиц резко снижается. Такие агрегаты могут быть достаточно большими, что затруднит их фагоцитоз инфузориями. Очевидно, в места скопления простейших, осуществивших первичный выбор пищи, оседает мало мелких частиц. Осевшие частицы вскоре будут склеены слизью, выделяемой одноклеточными организмами, находящимися в скоплении.

Можно думать, что в природе инфузории-седиментаторы редко выбирают пищу из равномерной взвеси пищевых и непищевых частиц, а случаи, когда в их пищеварительные вакуоли попадают одни непищевые частицы, маловероятны. Отсюда становится понятным, почему и в экспериментальных условиях эти простейшие не проявляют ни вторичного, ни третичного выбора пищи.

#### SUMMARY

Occurrence of three types of food choice in *Paramecium caudatum* suggested earlier by Railkin and Seravin (1974) has not been confirmed by present experiments. It has been found that *Paramecium caudatum* and *Spirostomum ambiguum* are able to discriminate food particles (bacteria, yeast) from other ones (coal, India ink), when suspensions of such particles are placed independently on the bottom of the same glass. However, these ciliates cannot choose the particles



of edible material mixed together with inedible one. It is supposed that in this case the choice of food is possible due to positive chemotactic response of the animals. The results have also shown that the whole cycle of digestion, up to elimination of particles from the cytoplasm lasts similar period of time irrespective of the type of ingested material, edible or not. Related problems presented by other authors are discussed.

## REFERENCES

- Adler J. 1974: Chemotaxis in bacteria. In: *Biochemistry of Sensory Function* (ed. L. Jaenicke), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 107-132.
- Berger J. 1977: "Imprinting" in *Didinium*: The effect of prior diet on its feeding behaviour. *Abstr. Fifth Int. Congr. Protozool.*, New York 1977, 42.
- Bishop A. 1923: Some observations upon *Spirostomum ambiguum* (Ehrenberg). *Q. J. Microsc. Sci.*, 67, 391-434.
- Bozler E. 1924: Über die Morphologie der Ernährungsorganellen und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum* Ehrbg. *Arch. Protistenk.*, 49, 163-215.
- Bragg A. N. 1936: Selection of food in *Paramecium trichium*. *Physiol. Zool.*, 9, 433-442.
- Bragg A. N. 1939 a: Selection of food by *Protozoa*. *Turttox News*, 17, 19-25.
- Bragg A. N. 1939 b: Selection of food by *Protozoa*. *Turttox News*, 17, 41-44.
- Corliss J. O. 1979: The ciliated protozoa. Characterization, classification and guide to the literature. 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, 1979, 1-455.
- Curds C. R. 1973: The role of *Protozoa* in the activated-sludge process. *Am. Zool.*, 13, 161-169.
- Dembowski J. K. 1945: Tropizmy *Paramecium*. *Uspehi sovremennoj biologii*, 20, 187-205.
- Dive D. 1972: Nutrition holozoiqne de *Colpidium campylum*: Phénomènes de sélection et d'antagonisme avec les bacteries. *J. Protozool.*, 19 (Suppl.), 64-65.
- Dubinin M. M., Nikolaev K. M. and Polyakov N. S. 1973: Molekuljarnositovye efekty kak sledstvie aktivirovannogo haraktera fizičeskoj adsorbicii. In: *Kinetika i Dinamika Fizičeskoj Adsorbicii*. Nauka, Moskva, 26-32.
- Ehrenberg C. G. 1838: Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Leipzig, 1-547.
- Ermolenko N., Gendelman F. and Rabinovich L. 1937: Adsorbicija kislot žirnogo rjada briketirovannymi ugljami. *Colloid. Zh.*, 3, 297-301.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Ecology of ciliate infusoria. *Endeavour*, 36, 183-187.
- Fenchel T. 1968: The ecology of marin microbenthos. II. The food of marin benthic ciliates. *Ophelia*, 5, 73-121.
- Finogenova T. V., Illarionova B. I. and Lozinov A. V. 1973: Obrazovanie limonnyh kislot drožžami *Candida lipolytica* pri roste na n-alkanah. *Mikrobiologija*, 42, 790-794.
- Fischer-Defoy D. 1977: Studies on phagocytosis in *Climacostomum virens*. *Abstr. Fifth Int. Congr. Protozool.*, New York, 1977, 355.
- Gaevskaya N. S. 1949: Prostějše (*Protozoa*). In: *Žizn' presnyh vod SSSR*, 2, AN SSSR, Moskva-Leningrad, 229-310.
- Gogoleva E. V., Grechushkina H. H. and Egorov H. C. 1973: Vne-kletočne polysaharidy, sinteziruemye *Mycobacterium* na sredah s glukosoj i ramnosoj. *Mikrobiologija*, 42, 403-412.
- Gracheva I. M., Gavrilova H. H. 1972: Vlijanie količestva zasevaemyh drožžej *Saccharomyces carlbergensis* XI i čisla generacij na nakoplenie biomasny drožžej i obrasovanie vyšših spirtov. *Mikrobiologija*, 41, 287-291.
- Grębecki A. 1961: L'enregistrement microphotographique des courants d'eau autour d'un Cilié. *Experientia*, 17, 93-94.
- Greenwood M. 1894: On the constitution and mode of formation of "Food Vacuole" in Infusoria, as illustrated by the history of the processes of digestion in *Carchesium polypinum*. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, ser. B. 185, 355-384.
- Grittner I. 1951: Zur Nahrungsauswahl der Infusorien untersucht an *Paramecium caudatum* Ehrb. und *Stentor coeruleus* Ehrb. *Biol. Zbl.*, 70, 128-151.



- Gutierrez J. 1958: Observation on bacterial feeding by the rumen ciliate *Isotricha prostoma*. J. Protozool., 5, 122–126.
- Izumov G. I. 1948: Piscevaritel'nye processy u *Stylonychia mytilus*. Zool. Zh., 27, 305–312.
- Jahn T. L. and Bovee E. C. 1969: Protoplasmic movements within cells. Physiol. Rev., 49, 793–862.
- Jahn T. L., Bovee E. C., Dauber M., Winet H. and Brown M. 1965: Secretory activity of the oral apparatus of ciliates: Trails of adherent particles left by *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 118, 912–920.
- Jennings N. S. 1931: Behavior of the Lower Organisms. N. Y. Columbia Univ. Press, 1–366.
- Jones A. W. and Cloyd W. F. 1950: The adhesive function of the trichocysts of *Paramecium*. Turtox News, 28, 231–232.
- Jurkevich V. V. and Naumova T. I. 1973: Vydelenie malyh količestv  $\beta$ -fruktosy kletkami *Saccharomyces cerevisiae* i biologičeskoe značenie etogo javlenija. Biologičeskie nauki, 1, 95–98.
- Kachinsky N. A. 1965: Fizika počvy. M., Vyššaya škola, 1–323.
- Kidder G. W. and Stuart C. A. 1939: Growth studies on ciliates. I. The role of bacteria in the growth and reproduction of *Colpoda*. Physiol. Zool., 12, 329–340.
- Kiselev A. N. 1957: K voprosu o vlijanii himii poverhnosti grafitovyh tel na adsorbiciju voščestv različnogo stroenija. In: Poverhnostnye Himičeskie Soedinenija i ih Rol' v Javlenijah Adsorbicii. MGU Moskva, 79–81.
- Kroes H. W. 1972: Extracellular products from *Chlorococcum ellipsoideum* and *Chlamydomonas globosa*. Arch. Microbiol., 84, 270–274.
- Kuźnicki L. and Sikora J. 1972: The hypothesis of inverse relation between ciliary activity and cyclosis in *Paramecium*. Acta Protozool., 11, 243–250.
- Loyčjanskaja M. S., Plaka V. E. and Aravina A. A. 1965: Nakoplenie uksusnoj kisloty v razvivajuščesja kul'ture *Aerobacter acetii*. Trudy Petergofskogo Biologičeskogo Instituta, 19, 81–87.
- Losina-Losinsky L. K. 1923: K voprosu o sposobnosti infusorij naučat'sja vybirat' pišču. Izvestija Petrogradskogo naučnogo instituta P. F. Lesgafta, 12, 93–101.
- Losina-Losinsky L. K. 1929: Javlenija hemotaksisa v svjazi s vyborom piščy u infusorij. Dokl. Akad. Nauk SSSR, ser. A, 17, 403–408.
- Lubocka A. and Dembowski J. 1950: Circulation of food vacuole in *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Exp., 15, 19–36.
- Lund E. J. 1914: The relation of *Bursaria* to food. Selection in feeding and in extrusion. J. Exp. Zool., 16, 1–53.
- Metalnikov S. I. 1907: O pitanii infusorij i ih sposobnosti vybirat' pišču. Trudy Imperatorskogo Sankt-Peterburgskogo obščestva estestvoispytatelej, 38, 175–181.
- Metalnikov S. I. 1911: K fiziologii vnutrikletočnogo piščevarenija u prostejšyh. Izvestija Sankt-Peterburgskoj biologičeskoj laboratorii, 11, 3–121.
- Metalnikov S. I. 1914: Les infusoires peuvent-ils apprendre a choisir leur nourriture? Arch. Protistenk., 35, 60–78.
- Meyer O. 1967: Glockentiere im Tuscheversuch Beobachtung der Strömungsverhältniss und Nahrungsvakuolen. Mikrokosmos, 56, 294–297.
- Morduchaj-Boltovskaja E. D. 1965: Materialy po biologii infusorij Rybinskogo vodohranilišča. Trudy instituta biologii vnutrennih vod, 8, 3–11.
- Müller M., Röhlich P. and Törö I. 1965: Studies on feeding and digestion in Protozoa. VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its early effect on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 12, 27–34.
- Nakatani I. 1968: Chemotactic response of *Paramecium caudatum*. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., ser. 6, Zool., 16, 553–563.
- Narayanan T. K. and Rao G. R. 1976: Production of  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl) ethanol and  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl) lactic acid by *Candida* species. Can. J. Microbiol., 22, 384–389.
- Nefelova I. V., Chigalejchik A. G. and Silaev A. B. 1974: Nekotorye svoistva mutantov *Bacillus polymyxa* var. Ross i biosintez imi antibiotikov. Mikrobiologija, 43, 307–309.



- Nilsson J. R. 1979: Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Biochemistry and Physiology of Protozoa. 2nd ed., v. 2, Acad. Press, 339-379.
- Noland L. E. 1925: Factors influencing the distribution of fresh-water ciliates. Ecology, 6, 437-452.
- Orlovskaja E. E., Karvanen L. N. and Seravin L. N. 1978: Adaptivnyi karakter izmenenija piščevogo povedenija hiščnyh infusorij pri smene piščevykh objektov. Vestnik LGU, 21, 24-27.
- Railkin A. I. 1981: The quantitative analysis of the phagocytosis of *Paramecium caudatum* Ehrbg. and *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Acta Protozool. 20, 255-280.
- Railkin A. I. and Seravin L. N. 1974: Vybór pišči u *Paramecium caudatum* Ehrbg. Vestnik LGU, 3, 40-50.
- Rapport D. J., Berger J. and Reid D. B. W. 1972: Determination of food preference of *Stentor coeruleus*. Biol. Bull., 142, 103-109.
- Ray D. L. 1951: Agglutination of bacteria: A feeding method in the soil amoeba *Hartmannella* sp. J. Exp. Zool., 118, 443-465.
- Ricketts T. R. 1971: Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. The selectivity of uptake of particles and the adaptive increase the cellular acid phosphatase activity. Exp. Cell. Res., 66, 49-58.
- Sabanin A. N. 1907: K voprosu o mehaničeskom issledovanii počv. Počvovedenie, 3, 251-305.
- Schaeffer A. A. 1910: Selection of food in *Stentor coeruleus*. J. Exp. Zool., 8, 75-135.
- Seravin L. N. 1978: Obladajut li odnokletočnye životnye sposobnostju k naučeni-ju? In: Dviženie i Povedenie Odnokletočnyh Životnyh. Izdat. Nauka, Lenin-grad, 62-75.
- Seravin L. N. and Orlovskaja E. E. 1977: Feeding behaviour of unicellular animals. I. The main role of chemoreception in the food choice of carnivorous Protozoa. Acta Protozool., 16, 309-332.
- Seymour F. W. K. and Doetsch R. N. 1973: Chemotactic responses by motile bacteria. J. Gen. Microbiol., 78, 287-296.
- Shaposhnikov V. N., Kazanskaja T. B. and Orlova I. G. 1964: Harakteristika *Aerobacter cloacae* N28 v svjazi s nakopleniem v srede valina. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 159, 1408-1410.
- Shinoda K., Nakagava T., Tamamusi B., and Isemura T. 1966: Kolloidnye poverhnostnoaktivnye veščestva. Fisiko-himičeskie svoistva. Mir, Moskva, 1-317.
- Sleigh M. A. and Barlow D. 1976: Collection of food by *Vorticella*. Trans. Am. Micros. Soc., 95, 482-486.
- Smith M. W. 1937: Selection of food by the ciliate *Chilodon*. Science, 85, 544.
- Sonneborn T. M. 1970: Methods in *Paramecium* research. In: Methods in Cell Physiology (ed. D. M. Prescott), New York, Acad. Press, 4, 241-339.
- Sorokin Yu. I. 1974: Rol' bakterij v zizni vodojemov. Znanie, Moskva, 1-64.
- Stout J. D. 1956: Reaction of ciliates to environmental factors. Ecology, 37, 178-191.
- Tamar H. 1968: Observations on *Halteria bifurcata* sp. n. and *Halteria grandinella*. Acta Protozool., 6, 175-183.
- Taylor W. D. and Berger J. 1976: Growth responses of cohabiting ciliate protozoa to various prey bacteria. Can J. Zool., 54, 1111-1114.
- Tretjakova V. I., Gradova N. B., Maksimenko O. A. and Ruban E. L. 1971: Vlijanie organičeskih kislot na rost drožžej *Candida tropicalis* i *Candida guilliermondii* na sredah s uglevodorodami. Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 7, 521-525.
- Vlasova N. S., Klassen V. I. and Plaksin I. H. 1962: Issledovanie dejstvija reagentov pri flotacii kamennyh uglej. AN SSSR, Moskva, 1-172.
- Webb M. G. 1956: An ecological study of brackish water ciliates. J. Anim. Ecol., 25, 148-175.
- Zalashko N. V. and Pidoplichko G. A. 1974: Vlijanie kultivirovanija drožžej *Rhodotorula glutinis* 35 na sintez ekstrakletočnyh lipidov i polisaharidov. Mikrobiologija, 43, 245-249.
- Zevenhuisen L. P. T. M. and Ebbink A. G. 1974: Exocellular pyruvate-containing galactoglucan of *Achromobacter* spp. Arch. Microbiol., 96, 75-82.



Биологический институт Ленинградского Государственного Университета, Лаборатория зоологии беспозвоночных,  
Старый Петергоф Ленинградской обл., Ораниенбаумское шоссе 2, СССР

Laboratory of Invertebrate Zoology, Biological Research Institute, Leningrad State University,  
Leningrad 164, USSR

А. И. РАИЛКИН

A. I. RAILKIN

## Количественный анализ фагоцитоза *Paramecium caudatum* Ehrbg. и *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

The Quantitative Analysis of Phagocytosis in *Paramecium caudatum* Ehrbg. and *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Received on 14 January 1981

**Синопис.** Изучено влияние определенных физических и химических факторов на скорость фагоцитоза инертных частиц (алмаз, бентонит) *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum*. Частота образования пищевых вакуолей с частицами не крупнее 5  $\mu\text{m}$  для *Paramecium* и 7  $\mu\text{m}$  для *Spirostomum* не зависит от размера поглощаемых частиц. Существуют зоны оптимальных концентраций частиц и инфузорий в среде, где скорости фагоцитоза наибольшие. В сильно концентрированных суспензиях инертных частиц наблюдается снижение фагоцитарной активности инфузорий. Установлена экспериментальная зависимость между средним временем ( $\bar{t}$ ) образования одной пищевой вакуоли и средним числом частиц ( $\bar{n}$ ), содержащихся в ней:  $\bar{n} \times \bar{t} = \text{const}$ . Для объяснения этой зависимости предложена следующая гипотеза. Подпороговые раздражения, получаемые от отдельных частиц рецепторной системой ротового аппарата инфузорий, могут накапливаться (суммироваться). Достигнув пороговой величины, суммарное раздражение служит триггером сократительной активности эзофагальных фибрилл, отсекающих вакуоль от цитофаринкса. На основе гипотезы суммации подпороговых раздражений дается интерпретация факта стимуляции фагоцитоза *Spirostomum* основным коричневым G.

Одним из основных способов эндоцитоза инфузорий, облигатно питающихся бактериями, является фагоцитоз. Этот процесс можно условно разделить на три последовательных этапа: (1) транспорт веществ в ротовой аппарат инфузории из внешней среды, (2) формирование пищевой вакуоли, (3) отделение сформированной вакуоли от цитофаринкса в цитоплазму.

Изучение питания неподвижных инфузорий показывает, что фагоцитируемые вещества (обычно частицы) приносятся к цитостому токами воды, созда-



ваемыми перистомальными ресничками или мембранеллами (Grębecki 1961, Meyer 1967, Sleigh 1972, Sleigh and Aiello 1972, Sleigh and Barlow 1976). Блокирование деятельности перистомальных ресничек приводит к ингибированию фагоцитоза (Brutkowska 1967a). Определенную роль в транспорте частиц в цитофаринкс играют реснички перистомальных отделов ротового аппарата (Lund 1941). По мнению Stattler and Staehelin (1974), некоторые дифференцированные оральные реснички могут быть ответственны за более эффективное движение воды, содержащей пищевые частицы, в буккальную полость. Дополнительное влияние на транспорт веществ в ротовой аппарат, вероятно, оказывают токи воды, образующиеся вокруг плывущей инфузории (Grębecki 1965, Brutkowska 1967 b, Brutkowska et al. 1977).

Известно, что инфузории, питающиеся бактериями, могут заглатывать непищевые химически инертные частицы, то есть для индукции образования пищевых вакуолей достаточно одного механического раздражения (Brutkowska 1963, Müller et al. 1965, Rasmussen and Kludt 1970, Nilsson 1972, Nayar 1976, et al.). Это хорошо согласуется с тем, что у инфузорий рода *Paramecium* в эзофагальном отделе наблюдается непрерывная вибрация частиц в процессе формирования пищевой вакуоли (Mast 1947). По мнению Nilsson (1972), для индукции фагоцитоза у *Tetrahymena* достаточно всего нескольких частиц. Все сказанное не отрицает роли химических факторов как в стимуляции (Seaman and Macilla 1963, Nilsson 1971, 1972, Ricketts 1972, Brutkowska et al. 1973, Rasmussen 1973, Rasmussen and Modeveg-Hansen 1973), так и в индукции фагоцитоза (Seaman 1961, Rasmussen 1973). Остается неясным, какова относительная роль механорецепции и хеморецепции в индукции фагоцитоза у инфузорий, облигатно питающихся бактериями. Ricketts (1972) полагает, что рецепторный район локализован где-то на поверхности клетки, вероятно, вблизи цитостома или каким-нибудь образом с ним связан. По предположению Sattler and Staehelin (1974), некоторые специализированные реснички являются „food sensors”.

В процессе формирования пищевой вакуоли происходит концентрирование находящихся в эзофагальном отделе веществ (Lund 1941, Mast 1947, Nilsson 1971, 1972, Giese 1973, Rasmussen 1974). Rasmussen et al. (1975) показали, что при определенных условиях в пищевых вакуолях *Tetrahymena pyriformis* и *T. vorax* наблюдается 500-кратное концентрирование китайской туши из внешней среды. По гипотезе Rasmussen (1974) мембрана пищевой вакуоли может более эффективно транспортировать вещества в цитоплазму, чем остальная клеточная мембрана. По мнению Nilsson (1972), большую роль в концентрировании вещества в пищевых вакуолях *Tetrahymena* играет связывание его со слизистым материалом выстреливших мукоцист.

В процессе формирования пищевой вакуоли эзофагальный отдел ротового аппарата увеличивается в размере, благодаря напору воды, создаваемому ресничками (Segavin 1970), и в какой-то момент отделяется в цитоплазму в виде



пищевой вакуоли. Считается, что вакуоль отсекается от цитофаринкса за счет сокращения эзофагальных фибрилл, стягивающих ее у основания (Lund 1941, Mast 1947, Kitching 1956, Nilsson et al. 1973, Hoffman et al. 1974). Физиологический механизм, лежащий в основе этого процесса, не ясен.

Каким образом контролируется частота образования пищевых вакуолей? Существует предположение (Bozler 1924, Mast 1947, Kitching 1956, Dembowski 1959), что частицы, подносимые к цитостому, действуя как раздражители, вызывают ритмическую фагоцитарную активность. Bozler (1924) наблюдал в районе эзофагального мешка *Paramecium caudatum* периодический цитоплазматический поток, который, по его мнению, и отрывал пищевые вакуоли от цитофаринкса через каждые 30–60 секунд. Mast (1947), подтвердивший эти факты, считал однако, что цитоплазматический поток в районе цитофаринкса образуется в результате ритмической сократительной активности эзофагальных фибрилл. Dembowski (1959) установил, что накопление частиц туши в пищевых вакуолях *P. caudatum* зависит от концентрации китайской туши в среде, тогда как частота образования пищевых вакуолей не зависит от концентрации туши. На основании этих данных он пришел к выводу о существовании у *P. caudatum* автоматических глотательных движений. Это согласуется с мнениями тех авторов (Metalnikov 1914, Losina-Losinsky 1931, Müller et al. 1965), которые считают, что частота образования пищевых вакуолей с частицами фактически не зависит от концентрации данных частиц в среде. Curds and Vandyke (1966) описали у *P. caudatum* и *Histiculus vorax* чередующиеся фазы образования нормальных и пустых вакуолей при питании инфузорий в сильно концентрированных суспензиях бактерий. Рассмотренные данные косвенно свидетельствуют в пользу того, что фагоцитоз является ритмическим процессом.

Однако накопилось немало фактов, которые не согласуются с указанной точкой зрения. Благодаря исследованиям Schaeffer (1910), Bozler (1924), Curds and Cockburn (1968), Pavlovskaya (1973), установлено, что частота образования пищевых вакуолей с частицами зависит от концентрации данных частиц в среде. Известно также, что на частоту образования вакуолей влияет плотность культуры самих инфузорий (Curds and Cockburn 1968, Pavlovskaya 1973). Даже при постоянных внешних условиях скорость фагоцитоза может быть переменной величиной (Ricketts 1971). Быстрее всего образуется первая пищевая вакуоль, в дальнейшем скорость фагоцитоза снижается (Nilsson 1972). Эти данные ставят под сомнение предположение о ритмической природе фагоцитоза.

Нередко в целях удобства фагоцитоз инфузорий изучают не в той среде, в которой их культивируют. Обычно специально не исследуется как влияет адаптация к среде нового химического состава на фагоцитарную активность инфузорий. К сожалению, нам известна только одна публикация (Seravin 1957), специально посвященная этому вопросу. Вместе с тем исследования



такого рода необходимы как в методическом, так и в теоретическом аспекте.

В настоящей работе изучено влияние на фагоцитоз инфузорий *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* ряда физических и химических факторов среды с целью выяснения возможного физиологического механизма, контролирующего частоту образования пищевых вакуолей.

### Материал и методы

*Paramecium caudatum* (клон М-116) и *Spirostomum ambiguum* (популяция) культивировали на бактериях *Aerobacter aerogenes* в салатной среде при температуре  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  по методу Sonneborn (1970).

Для экспериментального кормления инфузорий использовали инертные частицы: синтетический алмаз (марка АСМ, Абразивный завод, Ленинград), бентонит (Огланглинское месторождение, Туркменская ССР), а также трижды перекристаллизованный азокраситель основной коричневый G (Технологический институт, Ленинград). Все фракции алмаза (1–2, 2–3, 3–5, 5–7, 7–10, 10–14, 14–20  $\mu\text{m}$ ) имели примесь частиц другой величины не более 1%. Фракции бентонита, полученные на основе метода двойного отмучивания (Sabanin 1907, Kachinsky 1965) имели средние размеры  $6.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (фракция 5–10  $\mu\text{m}$ , примесь 5%),  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (фракция 1–5  $\mu\text{m}$ , примесь 2%) и  $< 1 \mu\text{m}$  (без примеси). В ряде экспериментов использовали частицы бентонита, окрашенные 0.02% раствором основного коричневого G в течение 10 минут. Избыток азокрасителя удаляли многократным центрифугированием суспензии и заменой окрашенного раствора салатной или минеральной средой Лозина-Лозинского (0.1 g/l NaCl, 0.01 g/l KCl, 0.01 g/l CaCl<sub>2</sub>, 0.01 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g/l NaHCO<sub>3</sub>), снижая исходную концентрацию красителя в 100 000 раз. Фракции частиц алмаза и бентонита применяли в виде стерильных суспензий, концентрации которых определяли с помощью гемцитометра. Расчет концентрации суспензии бентонита  $< 1 \mu\text{m}$  приведен в Приложении. Во многих опытах, если в тексте не указано обратное, концентрация частиц в среде с простейшими составляла 5000 частиц в  $\text{cm}^3$ .

Через 3–5 часов после очередного кормления инфузорий отмывали от бактерий стерильной салатной средой<sup>1</sup> или минеральной средой Лозина-Лозинского и оставляли голодать 20–24 ч до начала эксперимента. При отмывке салатной средой пробирку объемом 12 ml наполняли густой культурой простейших. Когда основная масса инфузорий опускалась на дно, избыток жидкости над инфузориями сливали и наполняли пробирку новой порцией стерильной салатной среды. В результате повторных отмывок разбавляли исходную культуральную среду в 100–1000 раз. Отмывку минеральной средой в случае *Spirostomum* осуществляли аналогично, а *Paramecium* отмывали по методу Dryl (1961) в той же пропорции. За несколько часов до начала экспериментов инфузорий дополнительно отмывали от бактерий, доводя плотность культуры до начальной величины. Многократные наблюдения показали, что цитоплазма простейших, подготовленных к экспериментам, свободна от пищевых вакуолей.

Во всех экспериментах, если это специально не оговорено в тексте, плотность культуры инфузорий была всегда одной и той же и составляла 100 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Spirostomum* и 500 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Paramecium*. Для определения плотности культуры из пробирок с равномерно распределенными в ней инфузориями отбирали  $0.2 \text{ cm}^3$  среды. Простейших

<sup>1</sup> Здесь и в дальнейшем имеется в виду салатная среда с растворенным в ней 1 : 20 фосфатным буфером Зренсена (8.31 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2.72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> довести водой до 1000 ml), pH 7.0.



фиксируют 2% раствором формалина и при увеличении  $34 \times$  подсчитывали число инфузорий. Такую процедуру повторяли 3 раза. Плотность культуры рассчитывали по формуле:

$$p = \sum_{i=1}^3 N_i / 3v, \text{ где } p \text{ — концентрация инфузорий в } \text{см}^3, N_i \text{ — число инфузорий в объеме } v, \text{ равном } 0.2 \text{ см}^3.$$

Все эксперименты по фагоцитозу выполнены при температуре культивирования инфузорий. В стеклянном микроаквариуме смешивали  $0.4 \text{ см}^3$  культуры инфузорий и  $0.4 \text{ см}^3$  суспензии частиц или раствора азокрасителя. В опытах с частицами алмаза (удельный вес  $3.5 \text{ г/см}^3$ ) среду с простейшими перемешивали один раз в минуту стеклянной палочкой, чтобы обеспечить равномерное распределение частиц по всему объему микроаквариума. Через 10 мин от начала эксперимента *Paramecium* фиксируют 0.25% раствором формалина, а *Spirostomum* трижды с силой пропускали через пипетку. Контрольные эксперименты показали, что такое механическое раздражение полностью подавляет фагоцитоз *Spirostomum* на 30 мин. После выключения фагоцитоза инфузорий отмывали от частиц в 3–6 сосудах объемом 10 мл каждый. При увеличении  $600 \times$ ,  $900 \times$  или  $1350 \times$  определяли число пищевых вакуолей в цитоплазме 100 случайно выбранных простейших или число частиц в 50 вакуолях.

Скорость образования пищевых вакуолей (скорость вакуолеобразования) рассчитывали как среднюю арифметическую числа пищевых вакуолей, образованных одной инфузорией за 10 минут.

Следует сразу подчеркнуть, что постановке основных экспериментов всегда предшествовали предварительные контрольные эксперименты, в которых *Paramecium* (плотность культуры в опыте 500 клеток в  $1 \text{ см}^3$ ) и *Spirostomum* (100 клеток в  $1 \text{ см}^3$ ) кормили окрашенными основным коричневым G частицами бентонита (размер  $1\text{--}5 \text{ }\mu\text{м}$ , концентрация 5000 частиц в  $1 \text{ см}^3$ ). Контрольные эксперименты считали удачными (и только после этого проводили основные опыты), если скорость образования пищевых вакуолей *Paramecium* составляла 5.8–6.2, а *Spirostomum* — 3.6–3.9 вакуолей.

Изменение скорости образования пищевых вакуолей при адаптации инфузорий к среде нового химического состава изучали следующим образом. Инфузорий, культивируемых в салатной среде, готовили к экспериментам, как описано выше, и за 10–15 мин до начала опыта отмывали минеральной средой Лозина-Лозинского. Напротив, инфузорий, культивируемых в течение нескольких суток в минеральной среде (Polyansky 1957), в эксперименте отмывали стерильной салатной средой. Через каждые 1–2 ч определяли скорость образования инфузориями пищевых вакуолей с частицами бентонита (размер  $2.2 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{м}$ ), окрашенными основным коричневым G.

## Результаты

### Изменение фагоцитарной активности инфузорий при адаптации к среде нового химического состава

При переносе *Spirostomum ambiguum* из салатной в минеральную среду Лозина-Лозинского в течение первого часа скорость образования пищевых вакуолей достоверно снижается, а к концу второго часа достигает начальной величины (Рис. 1). В следующие два часа скорость образования пищевых вакуолей увеличивается до максимального значения, которое в 1.3 раза превы-



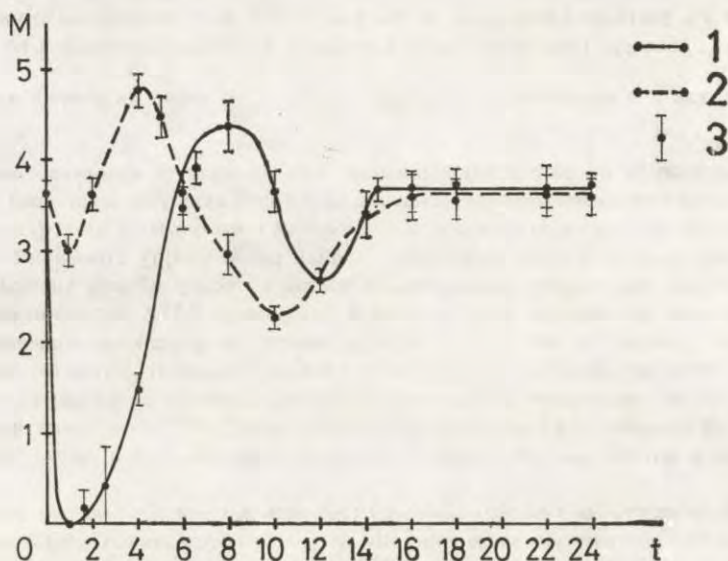


Рис. 1. Изменение скорости образования пищевых вакуолей *Spirostomum ambiguum* при адаптации к салатной среде (1) или к минеральной среде Лозина-Лозинского (2). Абсцисса:  $t$  — время, ч; Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей в одной инфузории; 3 — 99% доверительный интервал

Fig. 1. Changes of the rate of food vacuole formation by *Spirostomum ambiguum* adapted to lettuce (1) or to Lozina-Lozinski's mineral medium (2). Abscissa:  $t$  — time in hours; Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles in one specimen; 3 — 99% of confidence interval

падает начальный уровень. После этого фагоцитарная активность снова падает значительно ниже нормы и, наконец, через 14.5–16.0 часов от начала эксперимента восстанавливается до начального уровня. При переносе *Spirostomum* из минеральной в салатную среду события развиваются в том же направлении, однако соответствующие минимальные и максимальные значения фагоцитарной активности достигаются в более поздние сроки (Рис. 1). Интересно отметить, что после часовой инкубации инфузорий в салатной среде, происходит полное подавление фагоцитоза. Таким образом, при переносе *Spirostomum* из салатной в минеральную среду (или из минеральной среды в салатную) наблюдается цикл трехфазного изменения фагоцитарной активности, который завершается восстановлением скорости образования пищевых вакуолей до первоначального уровня через 14.5–16.0 часов.

Качественно таким же образом изменяется фагоцитарная активность *Paramecium caudatum* в ходе адаптации к салатной или минеральной среде. Скорость образования пищевых вакуолей восстанавливается до исходного значения через 18 ч.

Следовательно, чтобы изучить влияние какого-либо фактора (например, концентрации частиц в среде) на фагоцитарную активность инфузорий, необхо-



димо предварительно адаптировать их к той среде, в которой данное влияние будет изучаться. Все последующие эксперименты выполнены как раз с учетом этого обстоятельства.

Влияние размера и концентрации частиц, а также плотности культуры инфузорий на скорость образования пищевых вакуолей

Наличие в нашем распоряжении различных фракций алмазного порошка позволило строго количественно исследовать вопрос о влиянии на фагоцитарную активность инфузорий размера частиц. Как было установлено экспериментально, достаточно мелкие частицы от 1–2 до 5–7  $\mu\text{m}$  для *Spirostomum* и от 1–2 до 3–5  $\mu\text{m}$  для *Paramecium* заглатываются инфузориями с постоянной и максимальной скоростью (Рис. 2). При дальнейшем увеличении размера

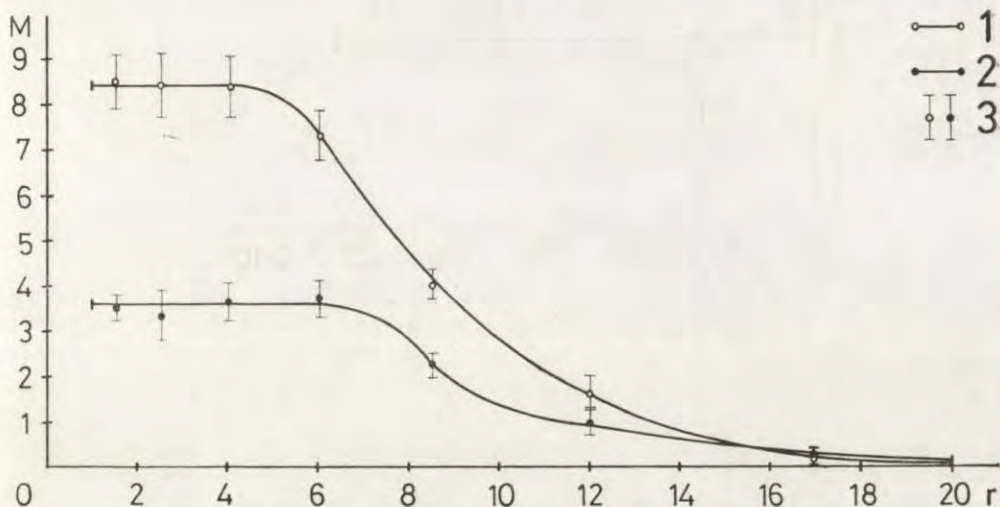


Рис. 2. Зависимость скорости образования пищевых вакуолей *Paramecium caudatum* (1) и *Spirostomum ambiguum* (2) от размера фагоцитируемых частиц алмаза. Абсцисса:  $r$  — размер частиц,  $\mu\text{m}$ ; Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей в одной инфузории; 3 — 99% доверительный интервал. Точки на графике соответствуют средним арифметическим значениям размера частиц данной фракции

Fig. 2. Dependence of the rate of food vacuole formation by *Paramecium caudatum* (1) and *Spirostomum ambiguum* (2) on the dimensions of diamond particles. Abscissa:  $r$  — dimensions of particles in  $\mu\text{m}$ ; Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles in one specimen; 3 — 99% of confidence interval. Points on the lines correspond to arithmetic means of particles dimensions in fractions used in experiments

частиц наблюдается закономерное снижение скорости образования пищевых вакуолей, которая становится близкой к нулю, когда фагоцитируются частицы 14–20  $\mu\text{m}$ . Следует упомянуть, что кристаллы алмаза такого размера



все-таки заглатываются инфузориями, хотя и очень редко. Можно констатировать, что с увеличением размера частиц наблюдается уменьшение числа

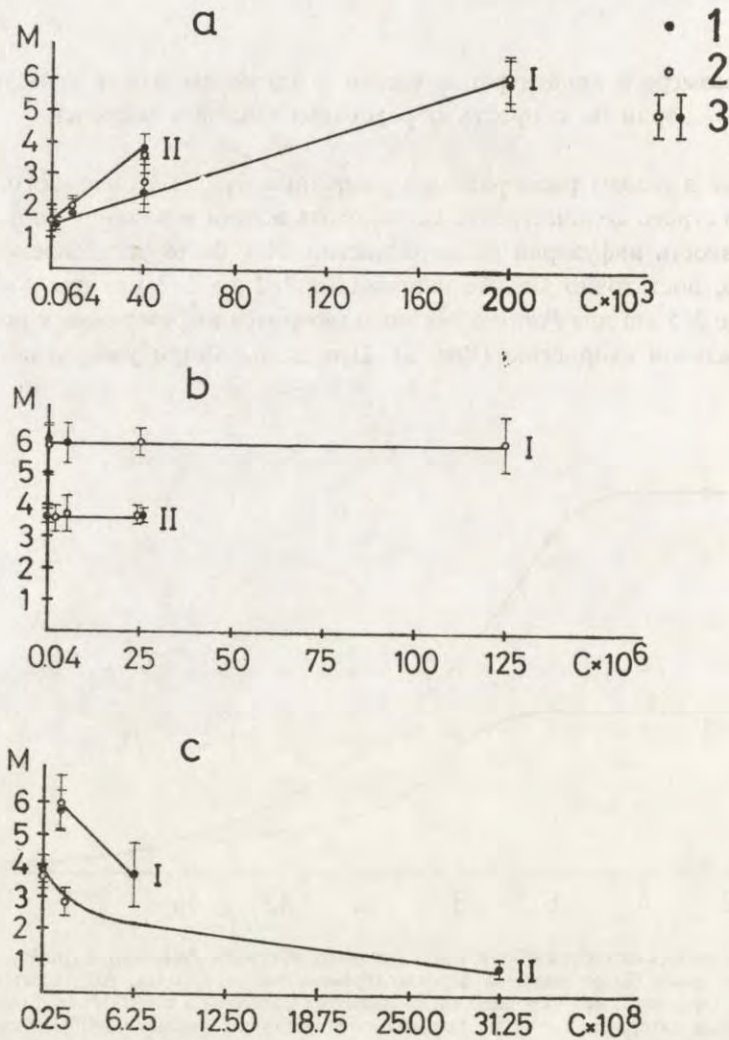


Рис. 3. Влияние концентрации частиц бентонита на образование пищевых вакуолей *Paramecium caudatum* (I) и *Spirostomum ambiguum* (II), адаптированных к салатной среде (1) или к минеральной среде Лозина-Лозинского (2): (а) малые концентрации частиц, (б) средние концентрации частиц, (с) большие концентрации частиц. Абсцисса:  $C$  — концентрация частиц,  $1/\text{cm}^3$ ; Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей в одной инфузории. 3 — 99% доверительный интервал

Fig. 3. Influence of bentonite particles concentration on food vacuole formation by *Paramecium caudatum* (I) and *Spirostomum ambiguum* (II) adapted to lettuce (1), or to Lozina-Lozinsk's mineral medium (2): a—low, b—higher and c—highest particles concentration in  $1/\text{cm}^3$ ; Abscissa:  $C$ —particles concentration in  $1/\text{cm}^3$ ; Ordinate: mean number of food vacuoles in one specimen; 3—99% confidence interval



частиц, попадающих в пищевые вакуоли. Однако этот вопрос нами специально не исследовался.

Экспериментальная зависимость индивидуальной скорости образования пищевых вакуолей инфузориями, адаптированными к салатной или к минеральной среде Лозина-Лозинского, от концентрации частиц бентонита ( $2.2 \pm \pm 0.1 \text{ m}$ ), окрашенных основным коричневым G, показана на Рис. 3. При малых концентрациях (от  $64$  до  $4 \times 10^4$  частиц в  $1 \text{ cm}^3$  для *Spirostomum* и от  $1.6 \times 10^3$  до  $2 \times 10^5$  частиц в  $\text{cm}^3$  для *Paramecium*) скорость вакуолеобразования линейно растет при увеличении концентрации частиц до максимального уровня, равного  $3.6\text{--}3.8$  пищевых вакуолей за  $10$  мин в расчете на одного *Spirostomum* и около  $6.0$  вакуолей за  $10$  мин в расчете на одного *Paramecium* (Рис. 3а). При средних концентрациях (от  $4 \times 10^4$  до  $2.5 \times 10^7$  частиц в  $1 \text{ cm}^3$  для *Spirostomum* и от  $2 \times 10^5$  до  $1.25 \times 10^8$  частиц в  $\text{cm}^3$  для *Paramecium*) скорость вакуолеобразования этих инфузорий остается постоянной, несмотря на  $625$ -кратное изменение концентрации частиц в среде (Рис. 3б). При больших концентрациях частиц (свыше  $1.25 \times 10^8$  частиц в  $\text{cm}^3$  для *Paramecium* и свыше  $2.5 \times 10^7$

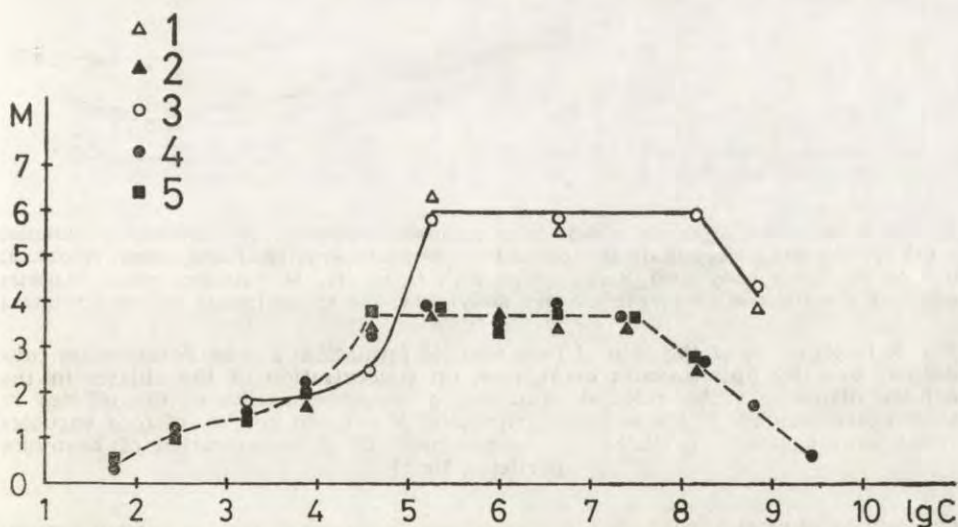


Рис. 4. Зависимость скорости образования пищевых вакуолей *Paramecium caudatum* (сплошная линия) и *Spirostomum ambiguum* (пунктирная линия) от концентрации и размера частиц бентонита. Абсцисса:  $\lg C$  — десятичный логарифм концентрации частиц ( $C, 1/\text{cm}^3$ ); Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей в одной инфузории. Размер частиц:

1)  $< 1 \mu\text{m}$     3)  $1\text{--}5 \mu\text{m}$     5)  $5\text{--}10 \mu\text{m}$   
 2)  $\leq 1 \mu\text{m}$     4)  $1\text{--}5 \mu\text{m}$     5)  $5\text{--}10 \mu\text{m}$

Fig. 4. Dependence of the rate of food vacuole formation by *Paramecium caudatum* (continuous line) and *Spirostomum ambiguum* (dotted line) on concentration and dimension of bentonite particles. Abscissa:  $\lg C$  — decimal logarithm of bentonite particles concentration ( $C, 1/\text{cm}^3$ ); Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles in one specimen. Dimensions of particles:

1)  $\leq 1 \mu\text{m}$     3)  $1\text{--}5 \mu\text{m}$     5)  $5\text{--}10 \mu\text{m}$   
 2)  $\leq 1 \mu\text{m}$     4)  $1\text{--}5 \mu\text{m}$     5)  $5\text{--}10 \mu\text{m}$

частиц в  $\text{cm}^3$  для *Spirostomum*) скорость образования пищевых вакуолей, вероятно, обратна пропорциональна логарифму концентрации частиц (Рис. 3с). Необходимо подчеркнуть, что результаты экспериментов в салатной и минеральной средах фактически совпадают (Рис. 3). Следовательно, у инфузорий, адаптированных к данной среде, химический состав среды не влияет на фагоцитарную активность.

Дополнительные эксперименты по кормлению инфузорий частицами бентонита размером  $6.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$  и  $\leq 1 \mu\text{m}$ , окрашенными основными коричневым G, показали, что скорость образования пищевых вакуолей с частицами  $\leq 7 \mu\text{m}$  для *Spirostomum* и  $\leq 5 \mu\text{m}$  для *Paramecium* не зависит от размера частиц, а определяется концентрацией частиц в среде (Рис. 4). Во всех дальнейших экспериментах использованы именно такие частицы, которые имеют оптимальные для фагоцитоза размеры.

Как было установлено, фагоцитарная активность инфузорий зависит от концентрации (плотности) их культуры (Рис. 5). Максимальная скорость об-

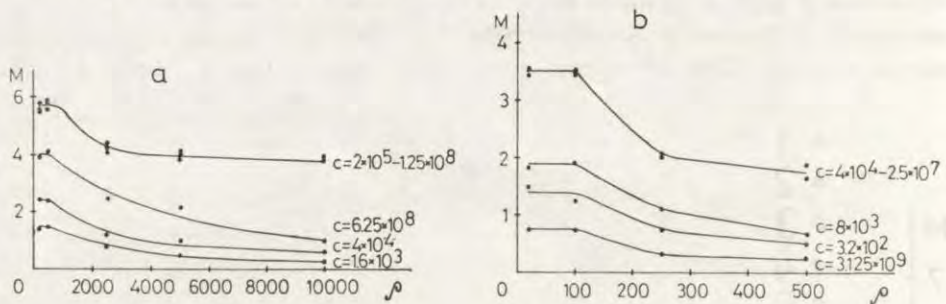


Рис. 5. Зависимость скорости образования пищевых вакуолей: (а) *Paramecium caudatum* и (б) *Spirostomum ambiguum* от концентрации (плотности культуры) инфузорий: Абсцисса:  $\rho$  — концентрация инфузорий, число клеток/ $\text{cm}^3$ ; Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей с частицами бентонита в одной инфузории.  $C$  — концентрация частиц бентонита  $1/\text{cm}^3$

Fig. 5. Dependence of the rate of food vacuole formation: a — by *Paramecium caudatum*, b — by *Spirostomum ambiguum*, on concentration of the ciliates in the culture (density of the culture). Abscissa:  $\rho$  — concentration of the ciliates in the culture, number of the cells/ $\text{cm}^3$ ; Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles filled with bentonite particles in one specimen;  $C$  — concentration of bentonite particles,  $1/\text{cm}^3$

разования пищевых вакуолей с частицами бентонита, окрашенными основным коричневым G, наблюдается при средних концентрациях частиц в среде и следующих плотностях инфузорий: 20–100 клеток в  $\text{cm}^3$  для *Spirostomum* и 100–500 клеток в  $\text{cm}^3$  для *Paramecium*. Указанные плотности культуры оказались оптимальными в отношении фагоцитарной активности инфузорий и при других концентрациях частиц бентонита. Как правило, при увеличении плотности культуры от 100 до 250 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Spirostomum* и от 500 до 2500 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Paramecium* скорость фагоцитоза резко снижается

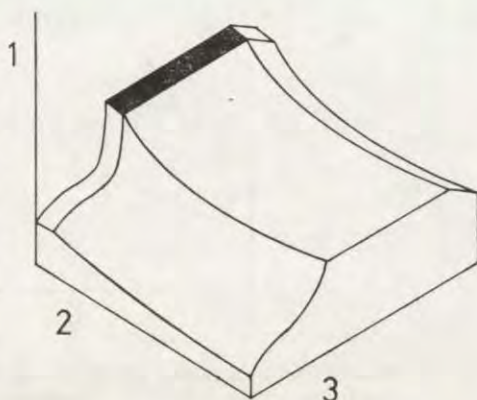


во всем диапазоне испытанных концентраций частиц. Дальнейшее увеличение плотности культуры инфузорий ведет лишь к незначительному снижению фагоцитарной активности (Рис. 5).

В обобщенном виде зависимость скорости образования пищевых вакуолей *Paramecium* и *Spirostomum* от концентрации частиц и инфузорий в среде показана на Рис. 6. Черный прямоугольник соответствует максимальной и посто-

Рис. 6. Зависимость скорости образования пищевых вакуолей *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* от концентрации частиц и инфузорий в среде (схема). 1 — Скорость вакуолеобразования, 2 — Концентрация инфузорий, 3 — Логарифм концентрации частиц

Fig. 6. Dependence of the rate of food vacuole formation by *Paramecium caudatum* and *Spirostomum ambiguum* on concentration of both particles and ciliates in the medium (diagram). 1 — Rate of vacuole's formation, 2 — Concentration of ciliates, 3 — Logarithm of particles concentration



янной фагоцитарной активности, проявляемой *Paramecium* и *Spirostomum* при оптимальном соотношении этих двух факторов.

#### Стимуляция и индукция фагоцитоза

Азокраситель основной коричневый G достоверно ( $P < 0.01$ ) стимулирует фагоцитоз *Spirostomum ambiguum* при различных концентрациях частиц бентонита в среде (Рис. 7). Максимальное число пищевых вакуолей, образованных этой инфузорией с неокрашенными частицами бентонита ( $2.2 \pm 0.1$  см) в течение 10 мин эксперимента, равно 1.3–1.4, тогда как с частицами, окрашенными азокрасителем — 3.6–3.7, то есть почти в 3 раза больше.

*Spirostomum*, находящиеся в растворе основного коричневого G, образуют пищевые вакуоли с этим веществом даже при отсутствии в среде частиц бентонита.<sup>2</sup> Для индукции образования пищевых вакуолей достаточно, чтобы

<sup>2</sup> Поглощение *Spirostomum* азокрасителя из раствора сопровождается образованием типичных пищевых вакуолей размером около 13  $\mu\text{m}$  и рассматривается нами как процесс фагоцитоза. Следует указать, что такая точка зрения основана на концепции Seravin (1970), согласно которой пиноцитоз и фагоцитоз осуществляются с помощью различных физиологических механизмов. В основу разделения между этими двумя процессами следует положить, как считает Seravin (1970), способ, посредством которого вещества транспортируются в клетку, а не характер поглощаемого вещества. „Пиноцитоз — это мембранный транспорт веществ, а фагоцитоз — системный транспорт различных веществ из внешней среды, в цитоплазму клетки” (Seravin 1970, page 102).

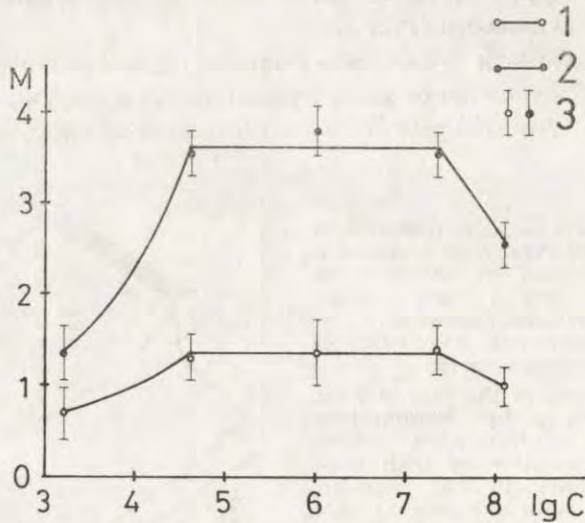


Рис. 7. Зависимость скорости образования пищевых вакуолей *Spirostomum ambiguum* от концентрации частиц бентонита, неокрашенных (1) и окрашенных (2) азокрасителем основным коричневым G. Абсцисса:  $\lg C$  — десятичный логарифм концентрации частиц ( $C$ ,  $1/\text{cm}^3$ ); Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей в одной инфузории. 3 — 99% доверительный интервал

Fig. 7. Dependence of the rate of food vacuole formation by *Spirostomum ambiguum* on bentonite particles concentration coloured (1), or not (2), by azodye basic brown G. Abscissa:  $\lg C$  — decimal logarithm of particle concentration ( $C$ ,  $1/\text{cm}^3$ ); Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles in one specimen. 3 — 99% confidence interval

раствор имел концентрацию  $10^{-6}$  М. Скорость вакуолеобразования *Spirostomum* является линейной функцией от логарифма концентрации азокрасителя (Рис. 8).

Основной коричневый G не индуцирует и не стимулирует фагоцитоз *Paramecium caudatum*.

#### Количество частиц в пищевой вакуоли

Частицы бентонита являются полупрозрачными, что дает возможность подсчитывать их число в пищевых вакуолях инфузорий. Рис. 9 показывает, что среднее число частиц бентонита, транспортируемых одной пищевой вакуолью из салатной среды или из минеральной среды Лозина-Лозинского в цитоплазму инфузорий, адаптированных к данной среде, определяется концентрацией частиц бентонита в среде и не зависит от того, окрашены частицы основным коричневым G или нет. Интересно отметить, что максимальное число частиц бентонита в пищевых вакуолях как *Paramecium*, так и *Spirostomum* фактически одинаково и в среднем равно 6, а минимальное число равно 1.



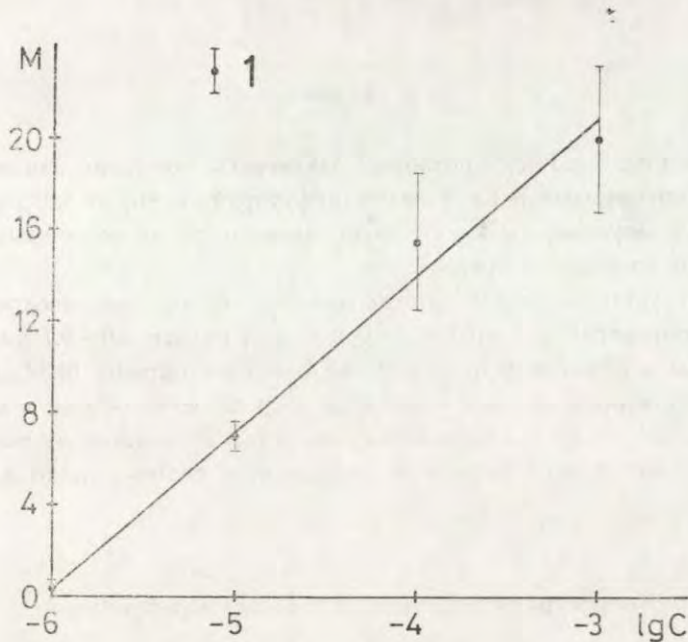


Рис. 8. Индукция фагоцитоза *Spirostomum ambiguum* азокрасителем основным коричневым G. Абсцисса:  $\lg C$  — десятичный логарифм молярной концентрации азокрасителя. Ордината:  $M$  — среднее число пищевых вакуолей с азокрасителем в одной инфузории. 1 — 99% доверительный интервал

Fig. 8. Induction of phagocytosis in *Spirostomum ambiguum* by azodye basic brown G. Abscissa:  $\lg C$  — decimal logarithm of azodye molar concentration. Ordinate:  $M$  — mean number of food vacuoles filled with azodye in one specimen. 1 — 99% of confidence interval

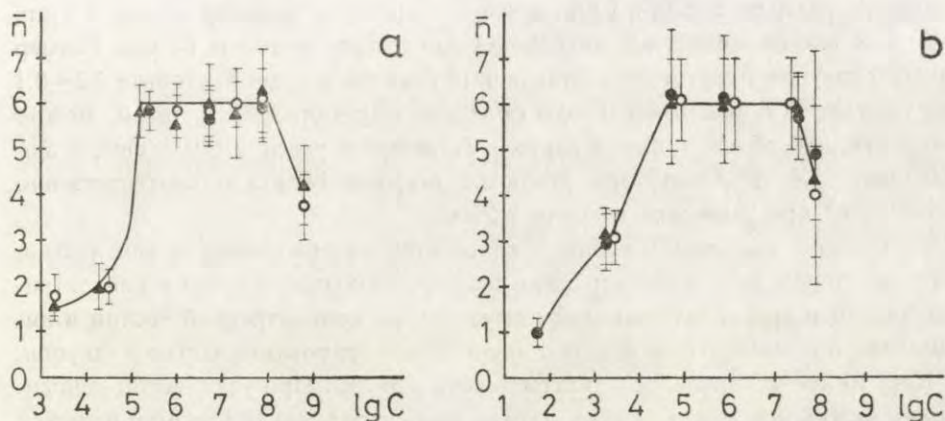


Рис. 9. Влияние концентрации частиц бентонита, окрашенных основным коричневым G (черный цвет) и неокрашенных (белый цвет) на скорость образования пищевых вакуолей (a) *Parametecium caudatum* и (b) *Spirostomum ambiguum*, адаптированных к салатной среде (кружки) или к минеральной среде Лозина-Лозинского (треугольники). Абсцисса:  $\lg C$  — десятичный логарифм концентрации частиц бентонита ( $C, 1/\text{cm}^3$ ); Ордината:  $\bar{n}$  — среднее число частиц бентонита в одной инфузории

Fig. 9. Influence of bentonite particles concentration coloured (black), or not (white), by basic brown G on the rate of food vacuole formation by: a—*Parametecium caudatum* and b—*Spirostomum ambiguum*, adapted to lettuce (circles), or to Lozina-Lozinski's mineral medium (triangles). Abscissa:  $\lg C$  — decimal logarithm of bentonite particles concentration ( $C, 1/\text{cm}^3$ ); Ordinate:  $\bar{n}$  — mean number of bentonite particles in one specimen

Сравнение Рис. 4 и Рис. 9 позволяет заключить, что число пищевых вакуолей, транспортируемых в цитоплазму инфузорий, и число частиц, заключенных в этих вакуолях, имеют сходную зависимость от логарифма концентрации частиц во внешней среде.

Как было установлено, у *Spirostomum* при фагоцитозе неокрашенного бентонита (концентрация  $1 \times 10^6$  частиц в  $1 \text{ cm}^3$ , размер  $6.0 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{m}$ ) первая пищевая вакуоль образуется в среднем за 4 мин и содержит  $10.84 \pm 0.51$  частиц, тогда как вторая вакуоль образуется в среднем за 14 мин и содержит  $2.96 \pm 0.25$  частиц. Первая пищевая вакуоль резко отличается от всех последующих вакуолей своими большими размерами и поэтому легко идентифицируется.

#### Концентрирование частиц в пищевой вакуоли

Эксперименты показали, что у адаптированных к данной среде инфузорий средний диаметр пищевой вакуоли определяется размером фагоцитируемых частиц и не зависит от числа частиц в вакуоли. Не зависит диаметр вакуоли также и от того, окрашены частицы основным коричневым G или нет, а также от характера среды (салатная или минеральная), в которой находятся в эксперименте инфузории. У *Spirostomum* пищевые вакуоли, содержащие частицы бентонита размером  $2.2 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{m}$ , имеют в среднем диаметр около  $8.5 \text{ }\mu\text{m}$ , тогда как вакуоли с частицами  $6.0 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{m}$  имеют диаметр  $14 \text{ }\mu\text{m}$ . Размер пищевой вакуоли *Paramecium* составляет  $10 \text{ }\mu\text{m}$  с частицами бентонита  $2.2 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{m}$ . Считая, что пищевая вакуоль обладает шарообразной формой, можно вычислить, что объем пищевой вакуоли *Paramecium* равен  $5 \times 10^{-10} \text{ cm}^3$ , а *Spirostomum* —  $1.4 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$  при диаметре вакуоли  $14 \text{ }\mu\text{m}$  и соответственно  $3 \times 10^{-10} \text{ cm}^3$  при диаметре вакуоли  $8.5 \text{ }\mu\text{m}$ .

Зная объем пищевой вакуоли и количество содержащихся в ней частиц, нетрудно определить концентрацию частиц в вакуоли. Сравнив концентрацию частиц в среде, окружающей инфузорию, с концентрацией частиц в пищевой вакуоли, можно определить степень концентрирования частиц в вакуоли. На Рис. 10 представлены результаты такого расчета. При увеличении концентрации частиц бентонита в среде степень концентрирования частиц в пищевой вакуоли уменьшается. В одинаковых условиях инфузории более эффективно концентрируют более мелкие частицы. При концентрации суспензии бентонита 64 частицы в  $1 \text{ cm}^3$  *Spirostomum* в  $5 \times 10^7$  раз увеличивают концентрацию частиц в пищевых вакуолях по сравнению с концентрацией частиц в среде вокруг инфузории. Это соответствует пропусканию через ротовой аппарат инфузории объема воды, равного  $5 \times 10^7$  объемов пищевой вакуоли и удержанию при этом всех частиц, поступающих с водой, в эзофагальном мешке, на дне которого формируется пищевая вакуоль. В условиях наших экспе-



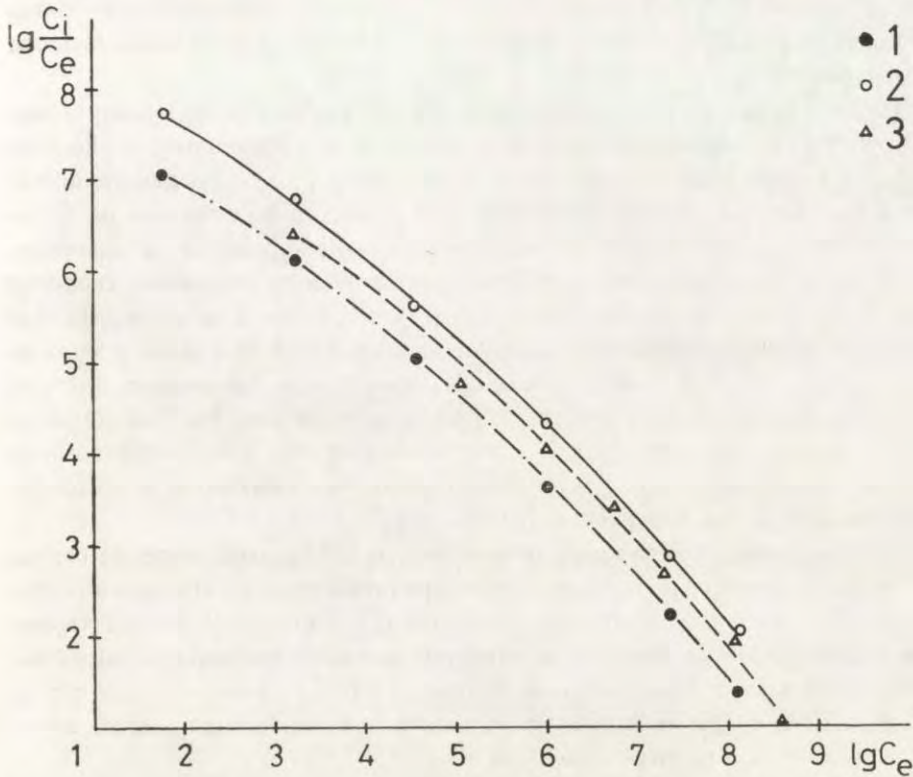


Рис. 10. Зависимость между концентрацией частиц бентонита во внешней среде и степенью концентрирования частиц бентонита в пищевых вакуолях *Paramecium caudatum* (треугольники) и *Spirostomum ambiguum* (кружки). Абсцисса:  $\lg C_e$  — десятичный логарифм концентрации частиц бентонита во внешней среде; Ордината:  $\lg \frac{C_i}{C_e}$  — десятичный логарифм отношения концентрации частиц бентонита в пищевой вакуоли ( $C_i$ ) к концентрации частиц бентонита во внешней среде ( $C_e$ ). Размеры частиц бентонита:

- 1)  $6.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$
- 2)  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$
- 3)  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$

Fig. 10. Dependence of bentonite particles concentration in outside medium and degree of bentonite particles concentration inside food vacuole in *Paramecium caudatum* (triangles) and *Spirostomum ambiguum* (circles). Abscissa:  $\lg C_e$  — decimal logarithm of bentonite particles concentration in outside medium; Ordinate:  $\lg \frac{C_i}{C_e}$  — decimal logarithm of relation between bentonite particles concentration inside food vacuole ( $C_i$ ) and bentonite particles concentration in outside medium ( $C_e$ ). Dimensions of bentonite particles:

- 1)  $6.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$
- 2)  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$
- 3)  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$

риментов максимальная степень концентрирования частиц в пищевых вакуолях *Paramecium* достигала  $2 \times 10^6$  раз, а минимальная степень концентрирования не превышала 10 раз как для *Paramecium*, так и для *Spirostomum*.

## Обсуждение

В настоящей работе исследованы количественные характеристики фагоцитоза инфузорий *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* в зависимости от ряда физических и химических факторов среды.

При этом показано, что при изучении фагоцитоза (как по-видимому и любой другой физиологической реакции одноклеточного организма) важно учитывать не только силу действующего раздражителя, но и его длительность. Этот вывод можно сделать на основе экспериментов по влиянию на фагоцитоз инфузорий адаптации к органической (салатной среде) или к минеральной среде Лозина-Лозинского. Наблюдавшееся фазное изменение скорости образования пищевых вакуолей (подавление, стимуляция, слабое подавление и, наконец, полное восстановление до нормы) через 14.5–16.0 часов у *Spirostomum* и через 18 часов у *Paramecium* показывает роль временного фактора в фагоцитарной активности инфузорий. Следует отметить, что еще Seravin (1957) установил фазный характер изменения скорости вакуолеобразования у *Paramecium caudatum* при длительном пребывании инфузорий в растворах солей, кислот, щелочей и ряда других веществ.

У адаптированных инфузорий химический состав среды и ее pH не оказывают дополнительного влияния на фагоцитарную активность. Именно поэтому в салатной среде и в среде Лозина-Лозинского, имеющих pH соответственно 7.0 и 7.4, наблюдается идентичный характер зависимости скорости образования пищевых вакуолей у адаптированных инфузорий от концентрации частиц в среде. Состав среды не влияет на количество частиц, попадающих в пищевые вакуоли и на размер самих вакуолей.

Все достаточно мелкие частицы (не крупнее 5  $\mu\text{m}$  для *Paramecium* и 7  $\mu\text{m}$  для *Spirostomum*), имеющие равные концентрации, индуцируют образование одинакового количества пищевых вакуолей. В то же время все более крупные частицы вызывают снижение фагоцитарной активности тем более значительное, чем больше их величина. Эти результаты можно объяснить наличием у изученных инфузорий ротового аппарата постоянного размера с цитостомом, обладающим растяжимостью и являющимся самой узкой частью ротового аппарата. Интересно отметить, что по данным Mast (1947), диаметр цитостома *Paramecium caudatum* составляет около 5  $\mu\text{m}$ , что в точности соответствует перегибу кривой „скорость фагоцитоза — размер частиц”.

Обращает на себя внимание тот факт, что в области средних концентраций суспензии бентонита в среде скорость образования пищевых вакуолей *Paramecium* и *Spirostomum* не зависит от концентрации частиц, несмотря на 625-кратное сгущение суспензии. Напротив, при малых и больших концентрациях суспензии бентонита концентрация частиц оказывает определенное влияние на скорость вакуолеобразования. Противоречия в литературных данных в вопросе о зависимости скорости образования пищевых вакуолей



у инфузорий от концентрации частиц в среде (Schaeffer 1910, Metalnikov 1914, Bozler 1924, Losina-Losinsky 1931, Dembowski 1959, Müller et al. 1965) объясняются, вероятно, тем, что разные авторы работали в различных диапазонах концентраций частиц.

При оптимальной плотности культуры, равной 100–500 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Paramecium* и 20–100 клеток в  $1 \text{ cm}^3$  для *Spirostomum* инфузории образуют максимальное и постоянное число пищевых вакуолей с частицами бентонита. При плотностях культуры выше или ниже этих значений фагоцитарная активность инфузорий снижается.

Таким образом существуют зоны оптимальных для фагоцитоза концентраций частиц и плотностей популяций инфузорий, что вполне согласуется с данными Curds and Cockburn (1968). Снижение фагоцитарной активности инфузорий в сильно концентрированных суспензиях (свыше  $2.5 \times 10^7$ – $1.25 \times 10^8$  частиц в  $1 \text{ cm}^3$ ), по-видимому, является лабораторным эффектом, так как даже для высоко продуктивных эвтрофных водоемов общее количество бактерий в  $1 \text{ cm}^3$  не превышает  $1 \times 10^7$  (Sorokin 1974).

Rasmussen et al. (1975) установили, что в пищевых вакуолях *Tetrahymena pyriformis* и *T. vorax* происходит 500-кратное концентрирование частиц китайской туши из внешней среды. В наших экспериментах показано, что эффект концентрирования частиц в пищевых вакуолях *Paramecium caudatum* и *Spirostomum ambiguum* выражен тем сильнее, чем меньше концентрация частиц в среде и чем меньше диаметр вакуоли. Максимальная степень концентрирования суспензии бентонита составляла для *Paramecium* почти  $2 \times 10^6$  раз, а для *Spirostomum* —  $5 \times 10^7$  раз. При прочих равных условиях эффективнее происходит концентрирование более мелких частиц.

На наш взгляд, эффект концентрирования твердых частиц в пищевых вакуолях инфузорий объясняется следующим образом. Объем пищевой вакуоли, образующейся на дне цитофаринкса, крайне мал, а частицы осаждаются сюда из большого объема. Поэтому неизбежно происходит концентрирование частиц. Очевидно, чем меньше будет концентрация суспензии в среде, тем больше окажется степень концентрирования частиц в вакуоли. Разумеется эти рассуждения справедливы лишь при постоянстве скорости транспорта частиц в ротовой аппарат. Следует учитывать также важную роль слизистого материала выстреливших мукоцист в связывании и концентрировании частиц при формировании пищевой вакуоли (Nilsson 1972, 1979).

Как было установлено экспериментально, на степень наполненности пищевых вакуолей *Paramecium* и *Spirostomum* частицами бентонита влияет концентрация этих частиц в среде. Причем, при малых концентрациях количество частиц в вакуолях линейно растет с увеличением концентрации частиц в среде. При средних концентрациях в пищевые вакуоли попадает постоянное и максимальное число частиц. Наконец, при дальнейшем увеличении концентрации частиц в среде их число в вакуолях снижается. Качественно характер этой



зависимости аналогичен ходу кривой „скорость фагоцитоза — концентрация частиц”. Полученные нами результаты не согласуются с данными Dembowski (1959), который обнаружил, что изменение концентрации частиц китайской туши в среде в 2, 4, 8, ..., 512 раз влияло на количество туши, попадающей в пищевые вакуоли *Paramecium caudatum*, но не влияло на количество вакуолей с этой краской. Dembowski (1959) полагает, что при фагоцитозе *Paramecium* имеют место два независимых процесса. Один из них — автоматические глотательные движения — не зависит от концентрации частиц в среде, второй — процесс накопления частиц в пищевых вакуолях — зависит от концентрации частиц. Это позволяет поставить вопрос о физиологическом механизме, контролирующем частоту образования пищевых вакуолей.

Реснички ротового аппарата инфузорий, облигатно питающихся бактериями, создают упорядоченные микротоки воды, подносящие суспендированные в воде частицы к постоянно открытому цитостому (Grębecki 1961, Meyer 1967, Sleigh 1972, Blake 1973, Sleigh and Barlow 1976). Часть частиц увлекается на дно цитофаринкса, который по мере наполнения частицами увеличивается в размере. В какой-то момент вздутый участок цитофаринкса отделяется в цитоплазму в виде пищевой вакуоли. Прямые данные на светомикроскопическом уровне (Lund 1941, Mast 1947) и косвенные экспериментальные данные (Nilsson et al. 1973, Hoffman et al. 1974, Nilsson 1979) говорят в пользу того, что отсечение вздутого участка цитофаринкса осуществляется эзофагальными фибриллами, стягивающими его у основания. Возникает вопрос: чем определяется момент срабатывания эзофагальных фибрилл, а, следовательно, частота образования пищевых вакуолей?

Анализ полученных экспериментальных данных, представленных в Табл. 1, показывает, что между средним временем ( $\bar{t}$ ) образования пищевой вакуоли и средним числом частиц бентонита ( $\bar{n}$ ), находящихся в ней, существует простая зависимость:

$$\bar{n} \times \bar{t} = \text{const.} \quad (1)$$

Время  $\bar{t}$  определяли, деля длительность опыта, равную 10 мин, на среднее число вакуолей, образованных за это время одной инфузорией. Таблица 1 показывает, что найденная закономерность соблюдается при различных условиях во всем диапазоне испытанных концентраций. Постоянство произведения статистически достоверно ( $P > 0.05$ ). Это позволяет сформулировать рабочую гипотезу. Подпороговые раздражения, получаемые от отдельных частиц рецепторной системой ротового аппарата инфузорий, могут накапливаться (суммироваться). Достигнув пороговой величины, суммарное раздражение служит триггером сократительной активности эзофагальных фибрилл, отсекающих пищевую вакуоль от цитофаринкса.

Гипотеза суммации подпороговых раздражений является альтернативной к предположениям о ритмической природе фагоцитоза инфузорий (Bozler



Таблица 1

Table 1

Соотношение между средним временем образования одной пищевой вакуоли и средним числом частиц в ней<sup>1</sup>

Relation between mean time of one food vacuole formation and mean number of particles inside this vacuole<sup>1</sup>

Название инфузорий Names of ciliates	Характер частиц бентонита Character of bentonite particles	<i>C</i>	<i>M</i>	$\bar{t}$	$\bar{n}$	$\bar{n} \times \bar{t}$
<i>Paramecium caudatum</i>	Частицы с азокрасителем или без азокрасителя Particles with or without azodye	$1.6 \times 10^3$	$1.69 \pm 0.15$	$5.92 \pm 0.52$	$1.82 \pm 0.16$	$10.77 \pm 1.33$
		$2 \times 10^5$	$5.97 \pm 0.18$	$1.68 \pm 0.05$	$5.90 \pm 0.26$	$9.91 \pm 0.52$
		$1 \times 10^6$	$5.70 \pm 0.24$	$1.75 \pm 0.07$	$5.92 \pm 0.20$	$10.36 \pm 0.54$
		$5 \times 10^6$	$5.79 \pm 0.19$	$1.73 \pm 0.06$	$5.77 \pm 0.22$	$9.98 \pm 0.52$
		$2.5 \times 10^7$	$5.94 \pm 0.12$	$1.68 \pm 0.03$	$6.00 \pm 0.22$	$10.08 \pm 0.41$
		$1.25 \times 10^8$	$5.96 \pm 0.21$	$1.68 \pm 0.06$	$6.22 \pm 0.30$	$10.45 \pm 0.62$
	$6.25 \times 10^8$	$3.66 \pm 0.28$	$2.73 \pm 0.21$	$3.82 \pm 0.24$	$10.43 \pm 1.03$	
<i>Spirostomum ambiguum</i>	Частицы без азокрасителя Particles without azodye	$1.6 \times 10^3$	$0.74 \pm 0.10$	$13.51 \pm 1.83$	$3.22 \pm 0.23$	$43.50 \pm 6.66$
		$4 \times 10^4$	$1.28 \pm 0.11$	$7.81 \pm 0.67$	$6.06 \pm 0.36$	$47.33 \pm 4.92$
		$1 \times 10^6$	$1.36 \pm 0.13$	$7.35 \pm 0.70$	$5.88 \pm 0.41$	$43.22 \pm 5.12$
		$2.5 \times 10^7$	$1.43 \pm 0.12$	$6.99 \pm 0.59$	$5.98 \pm 0.39$	$41.81 \pm 4.43$
		$1.25 \times 10^8$	$1.02 \pm 0.08$	$9.80 \pm 0.77$	$4.90 \pm 0.09$	$48.02 \pm 3.87$
Частицы с азокрасителем Particles with azodye	$6 \times 10^4$	$0.56 \pm 0.05$	$17.86 \pm 1.59$	$1.03 \pm 0.03$	$18.39 \pm 1.71$	
	$1.6 \times 10^3$	$1.87 \pm 0.10$	$5.36 \pm 0.29$	$3.16 \pm 0.22$	$16.94 \pm 1.49$	
	$4 \times 10^4$	$3.67 \pm 0.10$	$2.73 \pm 0.08$	$6.15 \pm 0.61$	$16.79 \pm 1.73$	
	$1 \times 10^6$	$3.58 \pm 0.13$	$2.79 \pm 0.10$	$6.07 \pm 0.57$	$16.94 \pm 1.69$	
	$2.5 \times 10^7$	$3.66 \pm 0.09$	$2.73 \pm 0.07$	$5.82 \pm 0.30$	$15.89 \pm 0.91$	
	$1.25 \times 10^8$	$2.63 \pm 0.07$	$3.80 \pm 0.10$	$4.16 \pm 0.78$	$15.81 \pm 3.00$	

<sup>1</sup> *C* — количество частиц бентонита в см<sup>3</sup>; *M* — скорость образования пищевых вакуолей;  $\bar{t}$  — среднее время в минутах образования одной пищевой вакуоли;  $\bar{n}$  — среднее число частиц в одной пищевой вакуоли.

<sup>1</sup> *C* — amount of bentonite particles in cm<sup>3</sup>; *M* — rate of food vacuole formation;  $\bar{t}$  — mean time of one food vacuole formation in minutes;  $\bar{n}$  — mean number of particles inside food vacuole.

1924, Mast 1947, Kitching 1956, Dembowski 1959). На наш взгляд, периодичность в отделении пищевой вакуоли от цитофаринкса связана с тем, что при постоянных условиях эксперимента определенное суммарное раздражение, приводящее к отделению пищевой вакуоли, достигается в среднем через равные интервалы времени, что, по-видимому, связано с постоянством скорости транспорта частиц в ротовой аппарат при этих условиях.

Образование пустых пищевых вакуолей (Bozler 1924, Mast 1947, Curds and Vandyke 1966), показывает, что для индукции фагоцитоза достаточно, чтобы суммарное воздействие частиц на рецепторную систему ротового аппарата достигло некоторой пороговой величины. Присутствие частиц в ротовом аппарате не является необходимым условием для отделения вакуоли. Именно по этой причине они могут быть выброшены из уже сформированной вакуоли.

Постоянство произведения  $\bar{n} \times \bar{i}$  означает также приложимость закона „всё или ничего” (закона „сила-длительность”) к фагоцитозу инфузорий. Известно, что этому закону подчиняется сократительная активность простейших при раздражении их электрическим током (Seravin 1971, Fabczak et al. 1973).

Возникает естественный вопрос: какова зависимость между средней продолжительностью действия ( $\bar{\tau}$ ) отдельной частицы как раздражителя и средним временем ( $\bar{i}$ ) образования одной пищевой вакуоли? Предположим, что частицы попадают в ротовой аппарат инфузории через равные интервалы времени  $\Delta \bar{i}$ . Тогда

$$\Delta \bar{i} = \frac{\bar{i}}{\bar{n} + 1}. \quad (2)$$

Очевидно, что

$$\bar{\tau}_1 > \bar{\tau}_2 > \dots > \bar{\tau}_n. \quad (3)$$

С другой стороны,

$$\bar{\tau}_1 = \bar{i} - \Delta \bar{i}, \bar{\tau}_2 = \bar{i} - 2\Delta \bar{i}, \dots, \bar{\tau}_n = \bar{i} - \bar{n}\Delta \bar{i}. \quad (4)$$

Тогда

$$\sum_{i=1}^n \bar{\tau}_i = \bar{\tau}_1 + \bar{\tau}_2 + \dots + \bar{\tau}_n = \bar{n}\bar{i} - \frac{(\bar{n} + 1)\bar{n}}{2} \Delta \bar{i}. \quad (5)$$

Подставляя в (5) значение  $\Delta \bar{i}$  из (2), получим:

$$\sum_{i=1}^n \bar{\tau}_i = \left( \bar{n}\bar{i} - \frac{\bar{n}\bar{i}}{2} \right) = \frac{1}{2} \bar{n}\bar{i}. \quad (6)$$

И окончательно в расчете на одну частицу:

$$\bar{\tau} = \frac{\bar{i}}{2}. \quad (7)$$

Таким образом, воздействие одной частицы как раздражителя на рецептор-



ную систему ротового аппарата инфузории продолжается только половину времени, необходимого для образования пищевой вакуоли.

Покажем, как можно применить гипотезу суммации подпороговых раздражений к анализу конкретных экспериментальных данных. При фагоцитозе *Spirostomum* неокрашенных частиц бентонита первая пищевая вакуоль образуется за 4 мин и содержит  $10.84 \pm 0.51$  частиц ( $\bar{n} \times \bar{t} = 43.36 \pm 2.04$ ), а вторая вакуоль формируется за 14 мин и содержит  $2.96 \pm 0.25$  частиц ( $\bar{n} \times \bar{t} = 41.44 \pm 3.50$ ). Принимая во внимание также данные Табл. 1, средние значения  $\bar{n} \times \bar{t}$  можно считать равными: 17 для фагоцитоза *Spirostomum* частиц бентонита, окрашенных основным коричневым G и 44 для фагоцитоза неокрашенных частиц.

Стимуляция фагоцитоза *Spirostomum* азокрасителем, адсорбированным на частицах бентонита, очевидно, связана с тем, что частицы действуют на рецепторную систему ротового аппарата не только как механические, но и как химические раздражители. Тогда пороговая величина раздражения  $\bar{S}$ , необходимая для отсечения пищевой вакуоли от цитофаринкса, будет равна:

$$\bar{S} = \frac{1}{2} (\bar{S}_1 + \bar{S}_2) \bar{n}_1 \bar{t}_1 = 8.5 (\bar{S}_1 + \bar{S}_2) \quad (8)$$

где  $\bar{S}_1$  и  $\bar{S}_2$  — соответственно механическое и химическое раздражение, получаемое рецепторной системой в единицу времени;  $\bar{n}_1$  — среднее число окрашенных азокрасителем частиц, транспортируемых одной пищевой вакуолью, образованной за время  $\bar{t}_1$ . Для случая фагоцитоза *Spirostomum* неокрашенных частиц бентонита получим относительно  $\bar{S}$ :

$$\bar{S} = \frac{1}{2} \bar{S}_1 \bar{n}_2 \bar{t}_2 = 22S_1 \quad (9)$$

где  $\bar{n}_2$  — среднее число неокрашенных частиц, транспортируемых одной вакуолью за время  $\bar{t}_2$ . Из соотношений (8) и (9) получим окончательно:

$$\frac{\bar{S}_2}{\bar{S}_1} \cong 1.6. \quad (10)$$

Таким образом, частицы бентонита, на которых адсорбирован азокраситель основной коричневый G, являются для *Spirostomum* в большей степени химическими раздражителями, чем механическими.

Можно надеяться, что предложенный подход, базирующийся на гипотезе суммации подпороговых раздражений, позволит объективно, строго количественно, оценивать относительную роль механорецепции и хеморецепции в индукции и стимуляции фагоцитоза у одноклеточных организмов и специализированных клеток многоклеточных животных.

Очевидно, химические и физические факторы, влияющие на фагоцитоз инфузорий, являются раздражителями разной силы. Поэтому суммарное раздражение, получаемой под влиянием этих факторов рецепторной системой ротового аппарата инфузорий, достигает порогового значения через различные сроки. Следовательно, частота образования пищевых вакуолей у инфузорий определяется значением порога и силой раздражителя, а это в свою очередь ставит задачу построения шкалы раздражителей.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Определение концентрации частиц размером $\leq 1 \mu\text{m}$

По закону Ламберта-Бера  $D = K \times C$ , где  $D$  — оптическая плотность раствора (или суспензии),  $C$  — концентрация раствора (или суспензии),  $K$  — коэффициент пропорциональности. Можно предположить, что для различных по размерам фракций микроскопических частиц одного и того же вещества величина  $K$  будет прямо пропорциональна квадрату диаметра частиц, а фактически площади их поперечного сечения. Действительно, если через жидкость, в которой равномерно распределены микроскопические частицы, пропустить монохроматический пучок света, имеющего длину волны, соизмеримую с линейными размерами частиц, то часть света будет поглощена частицами. Очевидно, ослабление пучка света будет пропорционально суммарной площади поперечного сечения всех частиц, которые оказались на пути света. Если пропустить один и тот же световой пучок через суспензии частиц одного вещества, имеющих равную концентрацию ( $C$ ), но различные размеры ( $d$ ) то оптическая плотность ( $D$ ) суспензии будет зависеть только от коэффициента  $K$ , который, очевидно, будет прямо пропорционален  $d^2$ .

При построении экспериментальной зависимости  $K$  от  $d^2$  использовали три фракции частиц бентонита со средними размерами 2.80, 4.89 и 5.99  $\mu\text{m}$ . Величину  $K$  для каждой фракции вычисляли из соотношения  $K = D/C$ . Оптическую плотность суспензии определяли на фотозлектроколориметре ФЭК-М, а концентрацию частиц в гемоцитометре. Полученные данные представлены в Табл. 2.

На основании данных табл. 2. был построен график зависимости  $K$  от  $d^2$  (Рис. 11). Величину  $K$  для частиц  $< 1 \mu\text{m}$  считали равной отрезку, отсекаемому на оси ординат прямой линией, выражающей зависимость  $K$  от  $d^2$ . Величина этого отрезка соответствовала значению  $K = 0.25 \times 10^{-8}$ .

Определив на ФЭК-М величину оптической плотности для суспензии частиц  $< 1 \mu\text{m}$ , по формуле  $C = D/K$  вычисляли значение концентрации суспензии частиц бентонита размером  $< 1 \mu\text{m}$ :

$$C = \frac{D}{K} = \frac{0.470}{0.25 \times 10^{-8}} = 2 \times 10^8 \text{ частиц в } 1 \text{ см}^3.$$

Стерильная суспензия бентонита именно такой концентрации была исходной для приготовления всех более разбавленных суспензий, использованных в экспериментах.



Таблица 2

Table 2

Исходные данные для построения графической зависимости  $K$  от  $d^2$  (Рис. 11)

Data of dependence  $K$  from  $d^2$  presented graphically (Fig. 11)

$d(\mu\text{m})$	2.80	4.89	5.99
$C(1/\text{cm}^3)$	$8.64 \times 10^6$	$3.60 \times 10^6$	$2.80 \times 10^6$
$D$	0.350	0.458	0.564
$K(\text{cm}^3)$	$4.05 \times 10^{-8}$	$12.72 \times 10^{-8}$	$20.14 \times 10^{-8}$

По точным данным см. Приложение

For more detailed explanations see Supplement

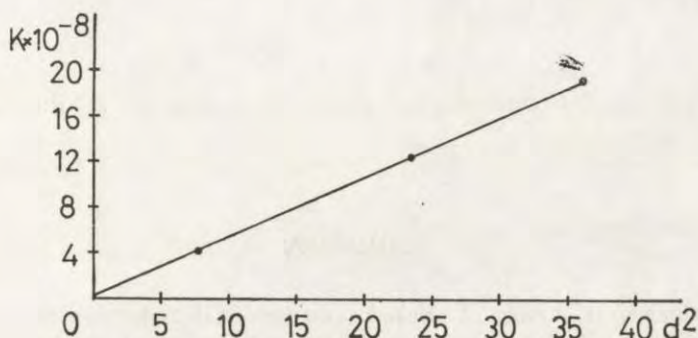


Рис. 11. Зависимость между  $K$  и  $d^2$  (объяснения в тексте). Абсцисса:  $d^2$  — квадрат среднего диаметра частиц,  $\mu\text{m}^2$ ; Ордината:  $K$  — коэффициент пропорциональности,  $\text{cm}^3$

Fig. 11. Relation between  $K$  and  $d^2$  (explanations in text). Abscissa:  $d^2$  — diameter,  $\mu\text{m}^2$ ; Ordinate:  $K$  — coefficient of proportionality,  $\text{cm}^3$

#### SUPPLEMENT

#### Determination of Concentration of Particles at Dimension of $\leq 1 \mu\text{m}$

After the rule of Lambert-Ber,  $D = K \times C$ , where  $D$  — is optical density of the solution (or suspension),  $C$  — concentration of this solution (or suspension) and  $K$  — coefficient of proportionality, it may be supposed that in various fractions of the same substance where the particles of different dimensions are present,  $K$  is directly proportional to the square of particle diameter, i.e., (more exactly), to the surface of its transversal section. Really, if the monochromatic bundle of light is passing across the solution of uniformly dispersed submicroscopical particles and, if the wavelength of the light is commensurable with linear dimensions of particles, then the light is absorbed partially by the particles. In fact, the weakening of the light bundle is proportional to the sum of surfaces of transversal sections of particles absorbing the passing light.

If a light bundle is passing across suspensions of a substance with particles of uniform concentration ( $C$ ) but of different dimensions ( $d$ ), the optical density ( $D$ ) of the suspension depends only on coefficient ( $K$ ) which is proportional directly to  $d^2$ .

During experimental construction of  $K/d^2$  relation three fractions of bentonite particles of mean dimensions 2.80, 4.89 and 5.99  $\mu\text{m}$  were used.  $K$  value for every fraction was calculated from relation  $K = D/C$ . Optical density of the suspension was measured on photoelectrocolorimeter (FEK-M). Concentration of particles was counted on haemocytometer. Data are presented in Table 2. Dependence  $K$  on  $d^2$  is also presented graphically (Fig. 11).  $K$  value for  $\leq 1 \mu\text{m}$  particles has been evaluated as a fragment on ordinate at magnitude of  $K = 0.25 \times 10^{-8}$ , designated by the line of dependence of  $K$  on  $d^2$ .

The optical density measured on FEK-M for  $\leq 1 \mu\text{m}$  of bentonite particles suspension allowed to calculate the concentration of such particles suspension:

$$C = \frac{D}{K} = \frac{0.470}{0.25 \times 10^{-8}} = 2 \times 10^8 \text{ particles in } 1 \text{ cm}^3.$$

Suspension of such concentration served as a stock for all dilutions used in experimental procedure.

#### SUMMARY

The influence of variety of physical and chemical factors on the rate of phagocytosis of diamond and bentonite particles in *Paramecium caudatum* and *Spirostomum ambiguum* was studied. The rate of food vacuole formation is independent on dimensions of particles when they are not greater than 5  $\mu\text{m}$  for *Paramecium* and 7  $\mu\text{m}$  for *Spirostomum*. The optimum density of both particles and protozoa concentrations in the medium, in which the highest rate of phagocytosis occurs, is noted. In more dense concentrations decreasing of phagocytic activity is observed. Experimental relation between mean time ( $\bar{t}$ ) of one food vacuole formation and mean number of particles ( $\bar{n}$ ) inside vacuole ( $\bar{n} \times \bar{t} = \text{const}$ ) is calculated. Working hypothesis of subthreshold stimuli summation is suggested. The single particle of suspension acting as subthreshold stimulus on the receptor inside oral apparatus (cytostome) of the ciliate cannot be effective as a trigger in the process of food vacuole formation. The sum of such single stimuli when reaches the threshold value is able to evoke the secretory activity of oesophageal fibrils, the mechanism responsible for separation of the vacuole from cytopharynx. On the base of this hypothesis it is possible to understand the stimulative effect of basic brown G on phagocytosis in *Spirostomum ambiguum*.

#### REFERENCES

- Blake J. 1973: A finite model for ciliated microorganisms. *Biomechanics*, 6, 133-140.
- Bozler E. 1924: Über die Morphologie der Ernährungsorganellen und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum* Ehrbg. *Arch. Protistenk.*, 49, 163-215.



- Brutkowska M. 1963: Effect of pH on the food vacuole formation in *Paramecium caudatum*. Acta Protozool., 1, 71-80.
- Brutkowska M. 1967a: Immobilization effect of NiCl<sub>2</sub> and food vacuole formation in *Paramecium caudatum*. Bull. Acad. pol. Sci., Cl II, 15, 119-122.
- Brutkowska M. 1967b: The effect of certain salt solutions and osmotic stimuli on ciliary movement and food intake in *Paramecium caudatum*. Acta Protozool., 4, 353-364.
- Brutkowska M., Dryl S. and Mehr K. 1973: Effects of ionic detergents on motor response and phagocytosis in *Paramecium caudatum* and *Tetrahymena pyriformis* GL. In: Progress in Protozoology, Clermont-Ferrand, Univ. Clermont Ser.-Sci. exactes et Natur., 68.
- Brutkowska M., Kubalski A. and Kurdybacha J. 1977: The influence of EGTA/Ca buffers on food vacuole formation by *Tetrahymena pyriformis* GL. Acta Protozool., 16, 195-200.
- Curds C. R. and Vandyke J. M. 1966: The feeding habits and growth rates of some freshwater ciliates found in activated-sludge plant. J. Appl. Ecol., 3, 127-137.
- Curds C. R. and Cockburn A. 1968: Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoxenic culture. J. Gen. Microbiol., 3, 343-358.
- Dembowski J. K. 1959: Psihologija životnyh. M., IL, 1-386.
- Dryl S. 1961: Chemotaxis in *Paramecium caudatum* as adaptive response of organism to its environment. Acta Biol. Exp., 21, 75-83.
- Fabczak S., Korohoda W. and Walczak T. 1973: Studies on the electrical stimulation of contraction of *Spirostomum*. 1. Conditions of the quantitative measurements. Cytobiologie, 7, 152-163.
- Giese A. C. 1973: *Blepharisma*. The biology of a light-sensitive protozoan. Stanford University Press, Stanford, California, 1-366.
- Grębecki A. 1961: L'enregistrement microphotographique, des courants d'eau autour d'un Cilié. Experientia, 17, 93-94.
- Grębecki A. 1965: Gradient stomato-caudal d'excitabilité des ciliés. Acta Protozool., 3, 79-100.
- Hoffmann E. K., Rasmussen L. and Zeuthen E. 1974: Cytochalasin B: aspects of phagocytosis in nutrient uptake in *Tetrahymena*. J. Cell Sci., 15, 403-406.
- Kachinsky N. A. 1965: Fisika počvy. M., Vysšaja škola, 1-323.
- Kitching J. A. 1956: Food vacuoles. Protoplasmatologia, IIID, 3b, 1-54.
- Losina-Losinsky L. K. 1931: Zur Ernährungsphysiologie der Infusorien: Untersuchungen über die Nahrungsauswahl und Vermehrung bei *Paramecium caudatum*. Arch. Protistenk., 74, 18-120.
- Lund E. E. 1941: The feeding mechanisms of various ciliated Protozoa. J. Morphol., 69, 563-574.
- Mast S. O. 1947: The food-vacuole in *Paramecium*. Biol. Bull., 92, 31-73.
- Metalnikov S. I. 1914: Les infusoires peuvent-ils apprendre a choisir leur nourriture? Arch. Protistenk., 35, 60-78.
- Meyer O. 1967: Glockentiere im Tuscheversuch Beobachtung der Strömungsverhältniss und Nahrungsvakuolen. Mikrokosmos, 56, 294-297.
- Müller M., Röhlich P. and Törö I. 1965: Studies on feeding and digestion in Protozoa. VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its early effect on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 12, 27-34.
- Nayar K. 1976: Usefulness of particulate matter for the growth of the peritrich ciliate *Telotrochidium*. Trans. Amer. Micros. Soc., 95, 378-384.
- Nilsson J. R. 1971: Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Protozool., (Suppl.) 18, 33.
- Nilsson J. R. 1972: Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 39, 84-110.
- Nilsson J. R. 1973: Certain factors influencing vacuole formation on *Tetrahymena*. In: Progress in Protozoology. Clermont-Ferrand, Univ. Clermont Ser.-Sci. exactes et Natur., 297.
- Nilsson J. R. 1979: Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Biochemistry and Physiology of Protozoa. 2th ed., v. 2, Acad. Press, 339-379.
- Nilsson J. R., Ricketts T. R. and Zeuthen E. 1973: Effects of cytocha-



- lasin B on cell division and vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. Exp. Cell Res., 79, 456-459.
- Pavlovskaya T. V. 1973: Vlijanje uslovij pitanija na skorost' potreblenija pišči i vremena generaciji infusorij. Zool. Zh., 52, 1451-1457.
- Polyansky Yu. I. 1957: Temperaturnye adaptacii u infusorij. 1. Zavisimost' teploustojčivosti *Paramecium caudatum* ot temperaturnyh uslovij suščestvovaniya. Zool. Zh., 36, 1630-1646.
- Rasmussen L. 1973: On the role of food vacuole formation in the uptake of dissolved nutrients by *Tetrahymena*. Exp. Cell Res., 82, 192-196.
- Rasmussen L. 1974: Food vacuole membrane in nutrient uptake by *Tetrahymena*. Nature, 250, 157-158.
- Rasmussen L. and Kludt T. A. 1970: Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell Res., 59, 457-463.
- Rasmussen L. and Modeweg-Hansen L. 1973: Cell multiplication in *Tetrahymena* cultures after addition of particulate material. J. Cell Sci., 12, 257-286.
- Rasmussen L., Buhse H. E. and Groh K. 1975: Efficiency of filter feeding in two species of *Tetrahymena*. J. Protozool., 22, 110-111.
- Ricketts T. R. 1971: Periodicity of endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. Protoplasma, 73, 387-396.
- Ricketts T. R. 1972: The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 19, 373-375.
- Sabanin A. N. 1907: K voprosu o mehaničeskom issledovanii počv. Počvovedenie, 3, 251-305.
- Stattler C. A. and Staehelin L. A. 1974: Ciliary membrane differentiations in *Tetrahymena pyriformis*. *Tetrahymena* has four types of cilia. J. Cell Biol., 62, 473-490.
- Schaeffer A. A. 1910: Selection of food in *Stentor coeruleus*. J. Exp. Zool., 8, 75-135.
- Seaman G. R. 1961: Some aspects of phagotrophy in *Tetrahymena*. J. Protozool., 8, 204-212.
- Seaman G. R. and Macilla R. 1963: Properties of factor from proteose-peptone which stimulates phagotrophy. In: Progress in Protozool., Proc. First int. Congr. Protozool., Prague 1961, Publ. House Czechosl. Acad. Sci., Prague 1963, 165.
- Seravin L. N. 1957: Vlijanie rastvorov himičeskih veščestv na fagocitoz *Paramecium caudatum*. Vestn. LGU, ser. biol., 3, 85-100.
- Seravin L. N. 1970: Fagocitoz i pinocitoz. Trudy Petergofskogo Biologičeskogo instituta, 20, 89-105.
- Seravin L. N. 1971: Mechanisms and coordination of cellular locomotion. In: Advances in Comparative Physiology and Biochemistry, 4, 37-111.
- Sleigh M. A. 1972: The activity of cilia in colleration of food by *Stentor*. J. Protozool., (Suppl.) 19, 52.
- Sleigh M. A. and Aiello E. 1972: The movement of water by cilia. Acta Protozool., 11, 265-277.
- Sleigh M. A. and Barlow D. 1976: Colleration of food by *Vorticella*. Trans. Amer. Micros. Soc., 95, 482-486.
- Sonneborn T. M. 1950: Methods in general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool., 113, 87-147.
- Sonneborn T. M. 1970: Methods in *Paramecium* research. In: Methods in Cell Physiology (ed. D. M. Prescott). N. Y., Acad. Press, 4, 241-339.
- Sorokin Yu. I. 1974: Rol' bakterij v žizni vodojemov. Znanie, Moskva, 1-64.



M. Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteura Street, 02-093 Warszawa, Poland and Laboratory of Invertebrate Animals, Biological Research Institute of Leningrad State University, Leningrad V-164, USSR

Maria BRUTKOWSKA  
and Eleonora E. ORLOVSKAJA

## The Influence of Detergents on Feeding Behaviour of Carnivorous Protozoon, *Dileptus anser*<sup>1</sup>

Received on 13 January 1981

*Synopsis.* The ingestion of food models (FM) by *Dileptus anser* is inhibited by higher concentrations of all detergents: SDS, CTAB, Triton X-100 and Tween 40. Exceptionally lecithin FM undergo phagocytosis at highest concentrations of SDS at the same level as in control medium. At lower concentration of SDS, CTAB and Triton X-100 decrease of phagocytic activity towards lecithin FM has observed. The ingestion of cysteine FM is also less effective at lower concentration of SDS. Cysteine FM phagocytosis was increased at lowest concentration of Tween 40. It is suggested that three independent chemoreceptor systems may exist on *Dileptus anser* cell surface: cysteine, lecithin and the third one for cephalin and Tween.

It has been shown recently (Seravin and Orlovskaja 1977) that some chemical compounds (cysteine, phospholipide-cephalin and lecithin and neutral detergents: tweens 40, 60, 80) can act as inducers of phagocytosis in *Dileptus anser*. Experimental data suggested heterogenic character of membrane receptors which should be regarded as polyfunctional system, depending on physiological state of ciliate related to nutrition (Seravin and Orlovskaja 1978), effects of external factors etc.

The possible effect of surface active substances on the course of phagocytosis evoked special interest of authors since it was proved in recent experimental studies that toxic, physiological and pathophysiological action of detergent may depend on possessed charge, hydrophylic-lipophilic balance (HLB) and other physicochemical properties (Dryl and Bujwid-Ćwik 1972, Bujwid-Ćwik and Dryl 1975,

<sup>1</sup> This work was partially supported by Polish Academy of Sciences during the stay one of the authors Dr. Maria Brutkowska in Leningrad State University.



Brutkowska et al. 1974, Brutkowska and Mehr 1976, Dryl and Mehr 1976, Brutkowska 1979). The aim of the present study was the analysis of physiological action of the following detergents on alimentary behaviour of *Dileptus anser*: anionic — sodium dodecyl sulfate (SDS), cationic — cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), neutral — polyoxyethylene p.t. octylphenol (Triton X-100) and also neutral — sorbitol monopalmitate (Tween 40).

### Material and Methods

*Dileptus anser* Leningrad's clone d-1 (Tavrovskaja, unpublished) was used in this study. The animals were cultivated in Prescott solution (Prescott and James 1955) at t. 20°C, pH 6.8 and *Tetrahymena pyriformis* served as a food. The experiments were carried out in Prescott medium with ciliates starved for 2 days.

Phagocytic activity of *Dileptus* was tested using the method of "chemical food models" (Seravin and Orlovskaja 1977). The appropriate amount of starch grains was put into 0.5 ml of substances inducing the phagocytic response of *Dileptus* like 5% Tween 40 (Gee Lawson Chemical, England), 2% Lecithine (Reachim, USSR), 2% Cephalin (Ferak, DDR),  $10^{-2}$  M Cystein (Reachim, USSR). (Orlovskaja and Seravin 1978). Suspensions prepared in this way were afterwards rinsed carefully with Prescott solution to get ten times lower concentration of inducers. Starch grains with inducers adsorbed on the surface were the food models (FM) supplied to *Dileptus*. The observations of its feeding behaviour were carried out on the glass depression slides where FM were earlier prepared. Subsequently, 0.1 ml of two times higher concentration of each tested detergent, or the same volume of control medium (Prescott solution) was added. To this mixture 20 do 60 specimens of *Dileptus* in 0.1 ml of culture medium were transferred. The animals remained in these conditions for 1 h and then the number of specimens with and without food vacuoles (f. v.) was counted. Mean number of f.v. forming ciliates, standard error and additional statistic calculations were made to characterize the phagocytic activity of *Dileptus*.

Four different detergents were tested during presented here experiments. SDS (Sigma) at concentrations  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-7}$  g/ml. CTAB (Koch Light) at concentrations  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-7}$  g/ml, neutral detergent Triton X-100, (Schuschart) at concentrations  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-7}$  g/ml and also neutral, sorbitol monopalmitate (Tween 40, Gee Lawson Chem.) at concentrations  $5 \times 10^{-2}$ – $5 \times 10^{-3}$  g/ml.

The basic, 0.5% concentrations of SDS, CTAB and Triton X-100 and 20% concentration of Tween 40 were diluted with bidistilled water, while all others were prepared by dilution with Prescott solution.

### Results

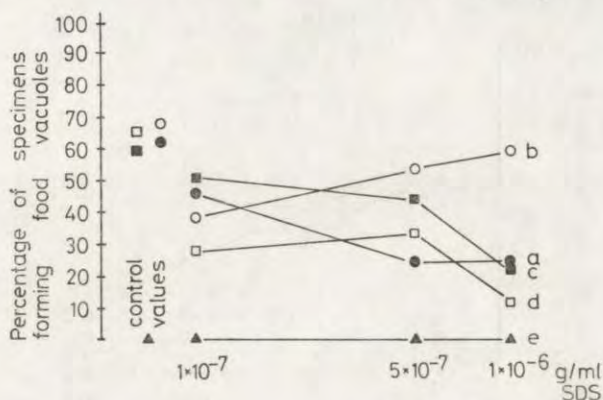
#### The Effect of SDS

Anionic detergent, SDS affected the cells of *Dileptus anser* at conc.  $5 \times 10^{-6}$  g/ml, killing ca. 50% of specimens during 20–30 min of exposure. Lower concentrations of this compound did not show the lethal



effects, although they changed temporarily the moving behaviour of the ciliate (Brutkowska 1979). At the highest sublethal concentration ( $1 \times 10^{-6}$  g/ml) the animals survived for more than 60 min without any observable signs of cell damage. So, it was sufficient time for carrying out the experiments with phagocytosis. The pure starch grains have never been phagocytized in the presence of SDS. At all concentrations of SDS a distinct change of phagocytic response with tween, lecithin, cephalin and cystein FM in relation to control specimens was observed (Fig. 1). High concentrations of SDS ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  g/ml)

Fig. 1. Ingestion of different FM by *Dileptus anser* exposed to various concentrations of SDS. a — Tween 40 FM, b — lecithin FM, c — cephalin FM, d — cystein FM, e — pure starch



inhibited significantly the phagocytic activity of *Dileptus* in the medium containing tween cephaline and cysteine FM. On the contrary, the percentage of cells phagocytizing lecithine FM reached the control level at the highest concentration,  $1 \times 10^{-6}$  g/ml of detergent (compare Table 1).

Table 1  
The effect of SDS on phagocytic activity of *Dileptus anser*

Type of FM	Concentr. of SDS g/ml			
	Control	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$
Tween 40	68.09 ± 3.77	48.14 ± 5.99	24.85 ± 7.54	25.44 ± 5.68
Lecithin	61.45 ± 5.16	40.49 ± 7.23	54.97 ± 4.49	60.72 ± 7.42
Cephalin	60.55 ± 4.20	51.37 ± 6.09	45.13 ± 4.57	23.81 ± 4.27
Cysteine	66.87 ± 4.89	28.45 ± 5.29	34.76 ± 8.46	18.90 ± 3.85
Pure starch	0	0	0	0

Data included in columns represent percentage of mean number of *Dileptus* specimens forming food vacuoles and standard error

### The Effect of CTAB

$5 \times 10^{-6}$  g/ml concentration of CTAB killed ca. 50% of *Dileptus* cells after 3 min of exposure. Concentration of  $1 \times 10^{-6}$  g/ml did not affect the ciliates during more than 60 min. i.e., during the time necessary to carry out the observations of the process of phagocytosis. Also here the disturbances in moving behaviour were observed. Similarly as in the medium of SDS, also here the pure starch grains used together with all sublethal concentrations of CTAB did not induce the phagocytic response of *Dileptus*. The process of phagocytosis of all FM's was significantly inhibited at  $1 \times 10^{-6}$  and  $5 \times 10^{-7}$  g/ml of detergent (Fig. 2). The

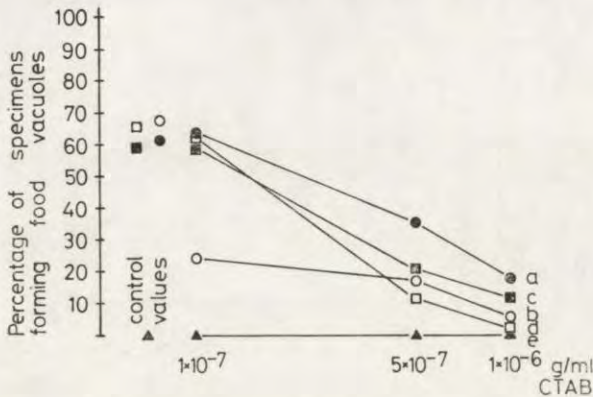


Fig. 2. Ingestion of different FM by *Dileptus anser* exposed to various concentrations of CTAB. a-e — explanations as in Fig. 1

level of tween, cephalin and cysteine FM phagocytosis was similar as in control conditions at  $1 \times 10^{-7}$  g/ml of CTAB concentration where the uptake of lecithin FM was still inhibited (Table 2).

Table 2  
The effect of CTAB on phagocytic activity of *Dileptus anser*

Type of CFM	Concentr. of CTAB g/ml			
	Control	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$
Tween 40	$68.09 \pm 3.77$	$63.05 \pm 5.88$	$37.72 \pm 5.17$	$18.71 \pm 3.56$
Lecithin	$61.45 \pm 5.16$	$24.26 \pm 3.22$	$17.07 \pm 6.49$	$6.19 \pm 1.51$
Cephalin	$60.55 \pm 4.20$	$59.40 \pm 5.70$	$23.70 \pm 9.48$	$12.37 \pm 7.55$
Cysteine	$66.87 \pm 4.89$	$63.29 \pm 6.03$	$11.24 \pm 2.22$	$0.49 \pm 0.49$
Pure starch	0	0	0	0

For explanations see Table 1



The Effect of Triton X-100

The significant inhibition of phagocytic activity towards all FM present in the medium was observed at the highest,  $5 \times 10^{-6}$  g/ml concentration of this detergent (Fig. 3). The number of phagocytizing specimens was higher at concentration  $1 \times 10^{-6}$  g/ml and reached the level similar to control at  $5 \times 10^{-7}$  g/ml concentration of this compound (Table 3).

The Effect of Tween 40

At concentration of this detergent  $1 \times 10^{-1}$  g/ml the animals were living longer than 24 h. However, the observations on the effect of Tween 40 on the process of FM uptake were carried out at lower,  $5 \times 10^{-2}$  g/ml concentration. The process of phagocytosis was significantly inhibited by two highest, conc. ( $5 \times 10^{-2}$  and  $2.5 \times 10^{-2}$  g/ml)

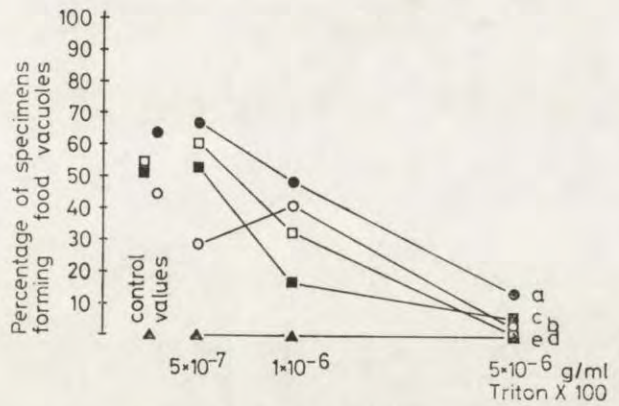


Fig. 3. Ingestion of different FM by *Dileptus anser* exposed to various concentrations of Triton X-100. a-e — explanations as in Fig. 1

Table 3

The effect of Triton X-100 on phagocytic activity of *Dileptus anser*

Concentr. of Triton X-100 g/ml	Control	$5 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$
Type of CFM				
Tween 40	64.07 ± 3.44	66.62 ± 5.64	48.96 ± 5.84	13.99 ± 5.48
Lecithin	45.26 ± 4.48	39.14 ± 9.69	41.68 ± 4.41	3.66 ± 0.55
Cephalin	52.35 ± 8.38	52.67 ± 10.30	16.31 ± 2.48	5.12 ± 1.48
Cysteine	54.20 ± 2.74	64.49 ± 13.21	32.91 ± 6.28	1.72 ± 1.72
Pure starch	0	0	0	0

For explanations see Table 1

of this compound. At concentration  $5 \times 10^{-3}$  g/ml of Tween 40 the level of phagocytosis reached the control value when tween lecithin and cephalin FM were present in the medium, while the slight stimulation of the phagocytic activity after immersion in cysteine FM's was observed. The effect of Tween 40, as one of inducers of phagocytosis at  $2.5 \times 10^{-2}$  and  $1 \times 10^{-2}$  g/ml concentration appeared when pure starch grains were added into the medium with *Dileptus* (Fig. 4, Table 4). The obtained results show:

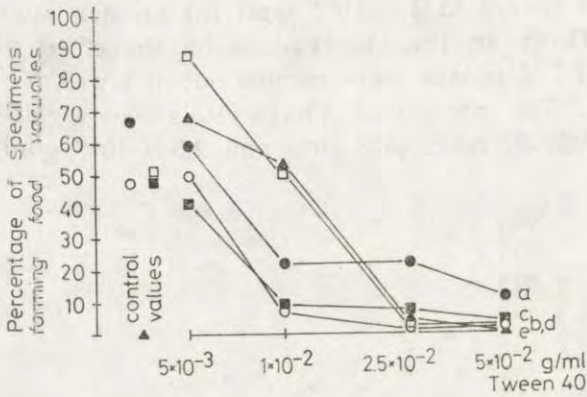


Fig. 4. Ingestion of different FM by *Dileptus anser* exposed to various concentrations of Tween 40. a-e — explanations as in Fig. 1

Table 4

The effect of Tween 40 on phagocytic activity of *Dileptus anser*

Concentr. of Tween 40 g/ml	Control	$5 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-2}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2}$	
Type of CFM						
Tween 40		$68.83 \pm 6.14$	$59.80 \pm 10.84$	$21.12 \pm 3.55$	$22.3 \pm 1.23$	$11.76 \pm 1.14$
Lecithin		$48.74 \pm 6.34$	$51.77 \pm 10.94$	$7.58 \pm 1.48$	$0.52 \pm 0.52$	$0.64 \pm 0.63$
Cephalin		$49.72 \pm 5.96$	$41.39 \pm 13.12$	$8.01 \pm 2.03$	$7.93 \pm 6.41$	$1.90 \pm 1.22$
Cysteine		$50.21 \pm 6.28$	$87.68 \pm 4.78$	$52.27 \pm 14.35$	0	0
Pure starch		0	$69.30 \pm 9.38$	$54.01 \pm 11.98$	$3.70 \pm 1.69$	0

For explanations see Table 1

(1) All higher concentrations of detergents inhibit as a rule the process of FM phagocytosis in *Dileptus anser* except uptake of lecithin FM in the medium of SDS, where percentage of specimens forming food vacuoles is the same at highest concentration, as in control conditions (Fig. 1).



(2) At lowest concentrations of detergents the phagocytic activity of *Dileptus* is either similar, or even higher than in control medium. Clear stimulating effect on cysteine FM phagocytosis appears only in the presence of the lowest concentration of Tween 40. Phagocytosis of lecithin and cysteine FM is less effective even at lowest concentration of SDS. The uptake of lecithin FM is also very weak at all concentrations of CTAB (compare Fig. 1 and 2 as well as 4).

(3) It looks that from two ionic detergents the cationic CTAB shows stronger inhibitory action on phagocytosis of *Dileptus* than the anionic SDS. This difference in reactivity of animals is noted very clearly when lecithin FM are present in media of above mentioned detergents (Fig. 1 and 2).

(4) *Dileptus anser* exposed to Tween 40 shows increased phagocytic activity towards starch grains at low concentrations of that compound (Fig. 4).

(5) Experimental data confirm the earlier findings concerning the effect of detergents on protozoan cells e.g., Dryl and Mehr (1976), Bratkowska and Mehr (1976).

It seems that the changes in phagocytic activity of *Dileptus* exposed to detergents might be attributed to the changed chemoreceptive properties of the cell surface.

The earlier experiments of Orlovskaja and Seravin (1978) showed significant differences between phagocytosis of cysteine and some other FM. High level of phagocytic activity in the presence of cysteine FM was noted both in normally fed and starved *Dileptus*. On the contrary tween nad cephalin FM were not attractive for fed ciliates. Thus, the physiological state of protozoa is in this case of great importance. This may suggest that the sensitivity of *Dileptus* to cysteine FM depends on one mechanism, while sensitivity to tween and cephalin FM on another one, what may support the suggestion of specificity of each receptor.

The difference between reactivity of *Dileptus* to cysteine and other types of FM is also seen in the presence of detergents. However, it is not clear, to what extent cysteine chemoreceptors may be affected by the action of both ionic and neutral detergents. May be that cysteine receptor has the protein character. This suggestion is based on Samovarov and Orlovskaja work (1979). Dibenamin, the compound which blocks the function of adrenoreceptors, inhibits also the phagocytic activity of *Dileptus* in the presence of cysteine FM. According to Komisarov and Abramiec (1977) L-adrenoreceptor has a protein character.

The higher level of *Dileptus* phagocytic activity towards cysteine



FM upon the influence of Tween 40 might be explained as cumulative effect of two inducers, similarly, as it was observed by Samovár and Orlovskaja (1979) in the case of cysteine–lecithine, cysteine–adrenaline and adrenaline–lecithin complex.

The feeding behaviour of *Dileptus* in relation to cysteine FM is greatly changed as compared to other FM uptake in the medium of SDS. However, the striking difference between feeding response of this protozoan to lecithin FM on the one hand, and to remaining FM on the other — is clearly seen also in the presence of this detergent (SDS). The obtained results are not easy to explain. May be an increase in the number of negative electric charges, as well as some conformational changes inside the cell membrane are responsible for described reaction of *Dileptus*.

Phagocytic activity of *Dileptus* toward lecithin FM is also significantly changed in comparison with its response to other FM in the medium of CTAB and of Triton X-100. It looks that the ability of animal to suspension uptake is blocked in this medium in some way. It is suggested that interaction between negatively charged surface of the ciliate and positively charged detergent may play the role in this case.

All these results seem to point out that not less than two or perhaps even three independent systems of chemoreceptors exist on *Dileptus* cell surface: cysteine, lecithin and the third — common one for cephalin and tween. They are of distinct chemical nature, show specific affinity to different compounds and probably they exist on different sites of the cell membrane. The last suggestion should be, of course, verified in farther experiments.

The main conclusion from Samovár and Orlovskaja work (1979) was that the cyclic nucleotides are involved in transduction of chemical stimuli necessary to induce the feeding response in *Dileptus anser*. This reaction is probably joined with activity of adenylocyclase complex. Data received by other authors on *Tetrahymena pyriformis* support this suggestion (Csaba and Lantos 1976, Csaba and Nagy 1976, Csaba et al. 1976, Rozenzweig and Kindler 1972). The activity of adenylocyclase depends fundamentally on physico-chemical state of membrane phospholipids. The specific interaction between polar groups of membrane phospholipids and adenylocyclase may take place (Engelhardt et al. 1978). During the action of detergents the properties of the membrane, among them also of phospholipids, can be changed (Perkins and Moore 1971, Prakash et al. 1978). This probably disturbs the normal phagocytic activity of *Dileptus*.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish gratefully acknowledge the kind help of prof. S. Dryl, Dr. J. Kazanowska and Miss L. Wychowaniec in critical reading of the manuscript and in offering instructive and valuable suggestions.

## REFERENCES

- Brutkowska M. 1979: Pathophysiological effects of detergents on *Dileptus anser*. J. Protozool., 26, 81A.
- Brutkowska M., Dryl S. and Mehr K. 1974: Action of detergents on motility of *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Protozool., 21, 440-441.
- Brutkowska M. and Mehr K. 1976: Effects of ionic detergents on phagocytic activity of *Tetrahymena pyriformis* GL and *Paramecium caudatum*. Acta Protozool., 15, 67-76.
- Bujwid-Ćwik K. and Dryl S. 1975: Effects of sodium dodecyl sulphate on motor response of *Paramecium caudatum* induced by K<sup>+</sup> ions. Acta Protozool., 13, 267-274.
- Csaba G. and Lantos T. 1976: Effects of cyclic AMP and theophylline on phagocytic activity of *Tetrahymena pyriformis*. Experientia, 32, 321-322.
- Csaba G. and Nagy S. V. 1976: Effects of vertebrate hormones on the cyclic AMP level in *Tetrahymena*. Acta biol. med. germ., 35, 1399-1401.
- Csaba G., Nagy S. V. and Lantos T. 1976: Are biogenic amines acting on *Tetrahymena* through a cyclic AMP mechanism? Acta biol. med. germ., 35, 259-261.
- Dryl S. and Bujwid-Ćwik K. 1972: Effects of detergents on excitability and motor response in *Protozoa*. Acta Protozool., 11, 367-372.
- Dryl S. and Mehr K. 1976: Physiological and toxic effects of detergents on *Paramecium caudatum*. Acta Protozool., 15, 501-513.
- Engelhardt V. H., Glaser M. and Storm D. R. 1978: Effects of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells. Biochemistry, 17, 3191-3200.
- Komisarov J. V. and Abramiec J. J. 1977: Farmakologičeskiye i strukturalnyje različija adrenergičeskikh receptorov misečnih kletok pozvonočnih. Uspiehi fizjologičeskikh nauk, No. 2, 75-93.
- Orlovskaja E. and Seravin L. N. 1978: Mezklonalnye različia piščevoj čustvitelnosti k himičeskim induktoram piščevoj reakciji u kiščenoj infuzorii *Dileptus anser*. In: "Fauna i Sistematika Odnokletočnych Životnih". Leningrad, AN SSSR.
- Perkins J. P. and Moore M. M. 1971: Adenyl cyclase of rat cerebral cortex. Activation by sodium fluoride and detergents. J. Biol. Chem., 246, 62-68.
- Prakash V., Sulakhe P. V. and Narayan P. 1978: Differential effects of non-ionic detergents on microsomal and sacrolemmal adenylate cyclase in cardiac muscle. Biochem. J., 175, 171-180.
- Prescott D. M. and James T. W. 1955: Culturing of *Amoeba proteus*. Expl. Cell Res., 8, 256-258.
- Rosenzweig Z. and Kindler S. H. 1972: Epinephrine and serotonin activation of adenyl cyclase from *Tetrahymena pyriformis*. FEBS Letters, 25, 221-223.
- Samovar A. and Orlovskaja E. 1979: Vlijanie biologičeskikh aktivnyh veščestv na piščevuju reakciju kiščenoj infuzorii *Dileptus anser*. Citologija, 21, 340-345.
- Seravin L. N. and Orlovskaja E. 1977: Feeding behaviour of unicellular animals. I. The main role of chemoreception in the food choice of carnivorous protozoa. Acta Protozool., 16, 309-332.





Department of General Biology and Parasitology, Institute of Biostructure, Medical Academy, Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, Poland

Henryk REBANDEL and Alicja KARPIŃSKA<sup>1</sup>

## Toxic Action of Colistin and Penicillin V and G on *Tetrahymena*. II. Inhibition of Phagocytic Activity

Received on 5 February 1981

**Synopsis.** Both kinds of penicillin lowered intensity of phagocytosis process in *Tetrahymena* independently of preincubation, but they produced during 20 h of preincubation period high percentage of non-phagocytizing cells. Colistin affected intensity of food vacuole formation stronger after preincubation but without influence of preincubation on the percentage of non-phagocytizing cells. Higher toxicity of penicillin V than of penicillin G was evidenced.

The results of earlier comparative studies on effects of colistin and two kinds of penicillin on *Tetrahymena pyriformis* (Rebandel et al. 1981) showed differences in the way of action between these antibiotics. Penicillin V appeared more toxic than penicillin G, however both penicillins were about 100 times less toxic than colistin. Basing upon the analysis of obtained results, the authors drew conclusions about possible action of colistin and penicillin on *Tetrahymena* cell membrane and about their presumably different mechanism of action.

It was shown by Brutkowska and Mehr (1976), Brutkowska et al. (1981), Nilsson (1976, 1977), Rasmussen (1976), Rasmussen and Ricketts (1977), and Ricketts (1972), that various external factors acting on cell membrane may also affect the process of phagocytosis in *Tetrahymena*. On the other hand, the duration of endocytosis depends both on physiological condition of the cell, as well as on the influence of external factors.

Supposition that the action of mentioned drugs interferes with the cell membrane of *Tetrahymena* suggests also their effect on the process

---

<sup>1</sup> Present address: Department of Microbiology, Biostructure Institute, Medical Academy, Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.



of phagocytosis. The experimental verification of the above mentioned hypothesis became the aim of the present study.

## Materials and Methods

The experiments were carried out on *Tetrahymena pyriformis* GL-C, obtained from the Nencki Institute of Experimental Biology in Warsaw. The animals were grown on 1.5% proteose-peptone (Difco) with 0.1% of yeast extract (Difco) supplemented with mineral salts, according to Plesner et al. (1964). Both stock and experimental cultures were cultivated using the transoculation system as described (Rebandel et al. 1981). The experimental cultures were grown in volume of 25 ml of the medium in 200 ml Ehrlenmayer flasks. Cells from the decelerating phase of culture growth ( $2.5 \times 10^5$ – $3.0 \times 10^5$  cells/ml) were used in all experiments.

Eighteen hours before each experiment (Brutkowska et al. 1977) the cells were rinsed with solution 1 mM  $\text{CaCl}_2$  + 1 mM TRIS/HCl (pH 7.3) by four times repeated centrifugation. The dilution of the basic medium was always higher than 1:2000. Before each experiment, the cell suspension was adjusted to the same density of about 1000 cells/ml. All experiments were carried out at room temperature (20–22°C), in depression slides, using the same TRIS solution in which the ciliates were starved as the diluent. India ink (Rotring) was used as the inductor of phagocytosis. After 10 min of experimental feeding the cells were fixed with formaldehyde. The number of food vacuoles was scored in 100 animals under the microscope. The number of food vacuoles formed by the cells during 10 min of experimental feeding was the measure of the intensity of phagocytosis process. Prior to each experiment, the phagocytosis process efficiency was controlled separately.

The following antibiotics were used: sulphate salt of colistin (Polfa), potassium salt of penicillin V (Polfa), potassium salt of penicillin G (Polfa) at concentrations (in mM/l): colistin —  $1.0 \times 10^{-1}$ ;  $5.0 \times 10^{-2}$ ;  $2.5 \times 10^{-2}$ ;  $1.3 \times 10^{-2}$ ;  $6.3 \times 10^{-3}$ ;  $5.0 \times 10^{-3}$ ;  $2.5 \times 10^{-3}$ ;  $1.0 \times 10^{-3}$ ;  $5.0 \times 10^{-4}$ ;  $2.5 \times 10^{-4}$ , penicillin V — 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0.5, penicillin G — 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0.5. Due to high concentrations of penicillin V and G in the experiments, control tests with comparable molar concentrations of KCl solution were performed. The slight lowering of pH of the medium evoked by the presence of colistin appeared to be insignificant for phagocytic activity. Antibiotics dilutions were mixed with the cell suspension in ratio 1:1, and the final sample volume was always 1 ml. Control samples were treated with a basic TRIS solution or with inductor suspension without antibiotics in the same way as experimentals. The experiments were repeated three times with new-prepared antibiotic solutions.

Two kinds of experiments were carried out: (1) the direct action effects were examined (the antibiotics were applied simultaneously with the phagocytosis inductor), (2) the prolonged action effects were examined (the cells were incubated before the test for 20 h in the tested antibiotic concentrations). The mean number of food vacuoles (with standard deviation) and the percentage of cells in the classes dependent on the number of food vacuoles was calculated. In special cases the process of phagocytosis was presented diagrammatically or cumulatively.



Results

The mean control level of phagocytic activity during 10 min of feeding was  $2.27 \pm 0.24$  of formed food vacuoles per cell with the percentage of cell frequency distribution in classes of the number of food vacuoles as shown on Fig. 1.

All three drugs influenced the phagocytosis process, when they were applied together with the inductor (Fig. 2 and 3 A). The comparison of the effects of both kinds of penicillin as potassium salts and potassium chloride alone at the same concentrations showed differences in response of *Tetrahymena*. The level of phagocytic activity in the presence of drugs

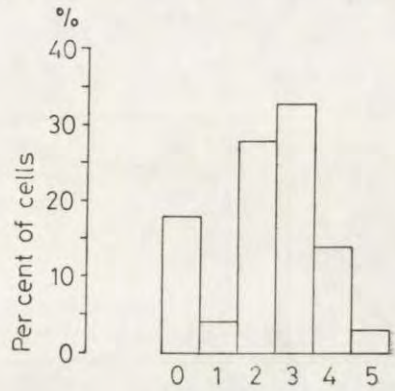


Fig. 1. The frequency distribution (expressed in percentage of animals) of food vacuoles formed in control cells of *Tetrahymena pyriformis* during 10 min of experimental feeding

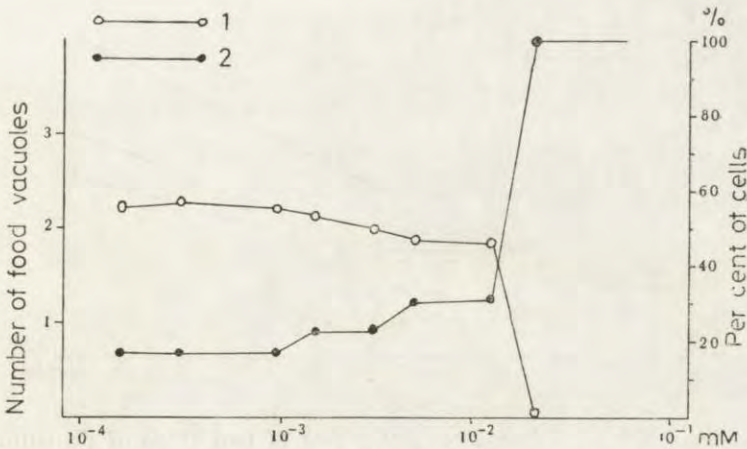


Fig. 2. The influence of immediate action of different concentrations of colistin on phagocytosis in *Tetrahymena pyriformis* during 10 min of experimental feeding. 1 — mean number of food vacuoles formed in all scored cells, 2 — percentage of non-phagocytizing cells

decreased significantly at low concentrations, whereas  $K^+$  ions inhibited phagocytosis at much higher (above ca. 15 mM) concentrations (Fig. 3). Only for colistin, the threshold-type effect of increase of antibiotic concentration appeared as a distinct separation between the completely blocking and presumably ineffective concentrations.

The obtained results seem to be easier for further interpretation if we consider separately the phagocytic activity for cells in which the process of phagocytosis takes place (Fig. 4) and the changes in the number of non-phagocytizing cells (Fig. 2 and 3 B). Qualitatively different effects of colistin and penicillin were obtained. Colistin, below the critical concentration which absolutely blocked the process of phagocytosis resulted in increased percentage of non-phagocytizing cells. Both kinds of penicillin when used at higher concentrations decreased both the

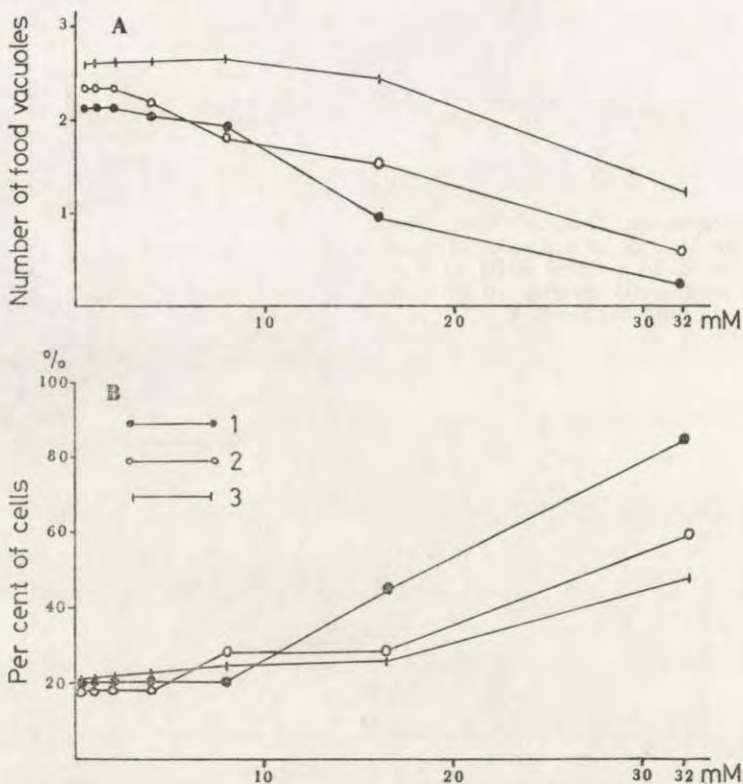


Fig. 3. The influence of different concentrations of two kinds of penicillin (potassium derivatives) on phagocytosis in *Tetrahymena pyriformis* during 10 min of feeding in comparison with the effects of KCl. A — mean number of food vacuoles in all animals in each scored sample, B — mean percentages of non-phagocytizing cells. 1 — penicillin V, 2 — penicillin G, 3 — KCl



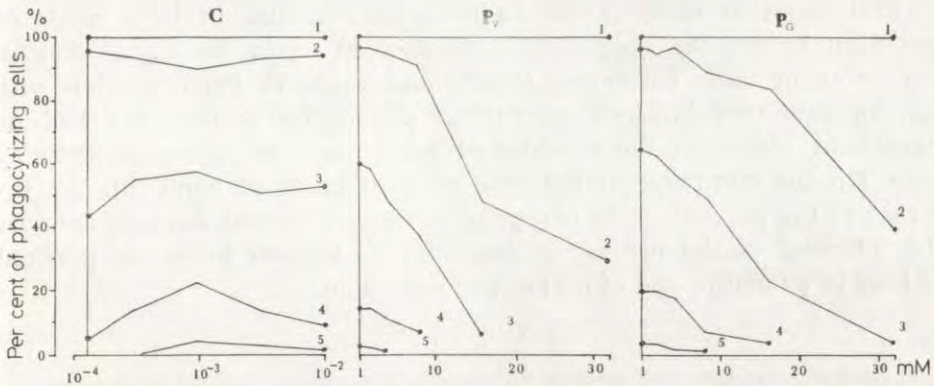


Fig. 4. Cumulative data on frequency distribution of food vacuoles formed by phagocytizing *Tetrahymena* cells in dependence on antibiotics concentrations. C — colistin, P<sub>V</sub> — penicillin V, P<sub>G</sub> — penicillin G

activity of food vacuole formation and increased the number of non-phagocytizing cells. In general, penicillin V disturbed more strongly the process of phagocytosis in *Tetrahymena* than penicillin G.

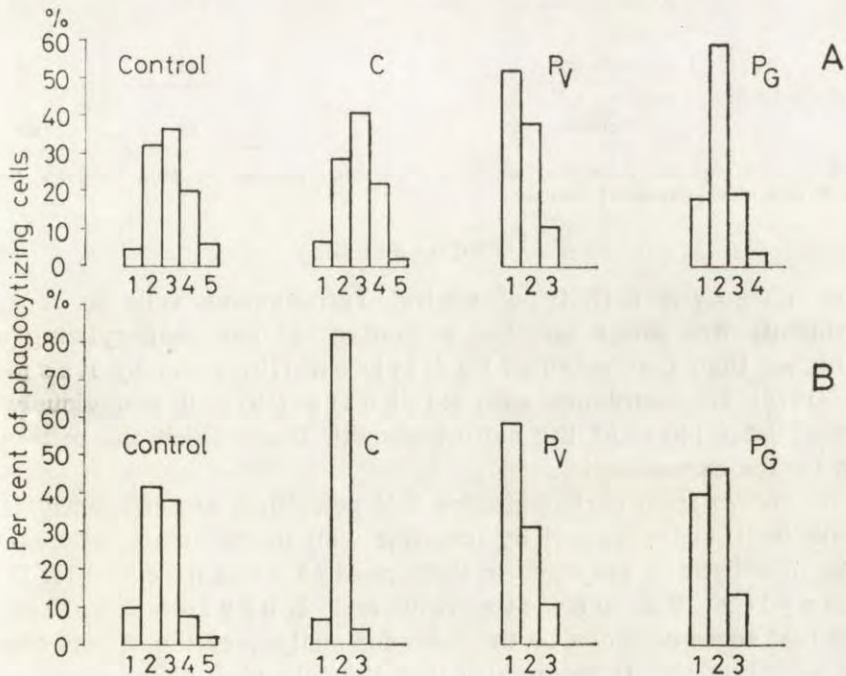


Fig. 5. Effect of preincubation with antibiotics on the frequency distribution of food vacuoles formed in phagocytizing *Tetrahymena* cells. A — immediate action without preincubation, B — effects after 20 h of preincubation. C — colistin 0.01 mM/l, P<sub>V</sub> — penicillin V 16 mM/l, P<sub>G</sub> — penicillin G 16 mM/l

Preincubation of cells for 20 h in colistin and in both kinds of penicillin before the phagocytic test, showed again the differences in the action of these antibiotics (Fig. 5 and Table 1). Preincubation with colistin caused a lowered activity of phagocytic process but had no significant affect on the established percentage of non-phagocytizing cells. On the contrary, in the case of both kinds of penicillin the increase of the percentage of non-phagocytizing cells was noticed, whereas the intensity of the process of phagocytosis seemed to be independent of kind of penicillin and of earlier preincubation.

Table 1

Effect of preincubation with antibiotics on phagocytic response of *Tetrahymena pyriformis*

		Control	Colistin 0.01 mM/l	Penicillin V 16 mM/l	Penicillin G 16 mM/l
Rate OF Fvf IN Phagocytizing cells	without preincubation	2.95	2.84	1.58	1.99
	after preincubation	2.74	2.05	1.52	1.72
Percentage of non- phagocytizing cells	without preincubation	18	33	41	28
	after preincubation	20	39	89	83

Fvf — food vacuole formation (expressed as mean number of food vacuoles formed during 10 min of experimental feeding).

### Discussion

The phagocytic activity of control *Tetrahymena* cells in repeated experiments was lower and the percentage of non-phagocytizing cells was higher than that obtained by Nillson (1976) and by Rasmussen (1976). In accordance with Ricketts (1972) it is obviously the effect of later phase of the culture growth from which the cells were taken for the experiments.

It is known from earlier studies that penicillins are efficiently taken up both by tissue cells and by intestine wall in mammals, whereas the uptake of colistin is very low in both cases (Auslander 1973, Bird and Nayler 1971, Jawetz 1970 and Kuryłowicz 1979). It seems that these data can be the basis for analysis of the effects observed in *Tetrahymena*. It seems also that the following phenomena can be distinguished in the process of phagocytosis: (1) potential possibility of the cell to react to the presence of phagocytosis inductor, necessary for formation of food vacuole, understood as the "transition point", (2) in-



tensity of the process of food vacuole formation in these cells which can exceed mentioned "transition point". The first of these phenomena seems to be connected with reserve of the membrane and the store of material for microtubule formation. The second one — could be rather related to the activity of functional proteins active in the process of phagocytosis.

When antibiotics were administrated simultaneously with the inductor, the concentration-type dependence of effects for penicillins and threshold-type dependence for colistin was observed. Colistin causes only slight increase in the percentage of non-phagocytizing cells below the critical concentration. Both kinds of penicillin cause the decrease of the intensity of phagocytosis process. Colistin lowers the intensity of phagocytosis process not earlier than after preincubation. It seems that penicillin V and penicillin G penetrate across *Tetrahymena* cell membrane easier than colistin. This fact is very similar to that specified for tissue cells in animals. In the opinion of Kuryłowicz (1979) colistin shows detergent-type activity. The obtained results may suggest that the threshold-type of action of colistin is connected with the damage of the *Tetrahymena* cell membrane. However, the ascertained effect of antibiotics on the dynamics of the process of phagocytosis can be also explained as their anti-metabolic action.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank dr. Maria Brutkowska and prof. Stanisław Dryl for critical reading of the manuscript. This work was supported by M.R.II. from Polish Academy of Sciences.

#### REFERENCES

- Auslander D. E., Felmeister A., Sciarrone B. J. and Segelman A. B. 1973: Proposed mechanisms for gentamycin transport. *J. Pharm. Sci.*, 62, 167.
- Bird A. E. and Nayler H. C. 1971: Design of penicillins. In: *Drug Design* (ed. Ariens E. J.), Academic Press, New York-London, II, 277.
- Brutkowska M. and Mehr K. 1976: Effects of ionic detergents on phagocytic activity of *Tetrahymena pyriformis* GL and *Paramecium caudatum*. *Acta Protozool.*, 15, 67-77.
- Brutkowska M., Kubalski A. and Kurdybacha J. 1977: The influence of EGTA/Ca buffers on food vacuole formation by *Tetrahymena pyriformis* GL. *Acta Protozool.*, 16, 195-200.
- Brutkowska M., Fritsch R. S. and Wollweber L. 1981: The effect of CIMET 3164 and CIMET 3393 on phagocytosis in *Tetrahymena pyriformis* GL, (in press).
- Jawetz E. 1970: Poymyxins: colistin, bacitracin, ristocetin and vancomycin. In: *Antimicrobial Therapy*, (ed. Kagan B. M. and Sunders W. B. co.), Philadelphia, London, Toronto, 91.

- Kuryłowicz W. (ed.) 1979: *Antybiotyki: Aktualny Stan Wiedzy*. PZWL.
- Nilsson J. R. 1976: Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, 40, 215.
- Nilsson J. R. 1977: On food vacuole formation in *Tetrahymena*. Abstr. Fifth Int. Congr. Protozool., New York, 1977, 310.
- Plesner P., Rasmussen L. and Zeuthen E. 1964: Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In: *Synchrony in Cell Division and Growth*. (ed. Zeuthen N.) Intersci. Publ., New York, London, Sydney, 543-564.
- Rasmussen L. 1976: Nutrient uptake in *Tetrahymena pyriformis*. *Carlsberg Res. Commun.*, 41, 144-167.
- Rasmussen L. and Ricketts T. R. 1977: Endocytosis, exocytosis and lysosomes. Post-Congress Publications, Fifth Int. Congr. Protozool., New York 1977, 140.
- Rebandel H., Gierczak A. and Karpińska A. 1981: Effects of toxic action of colistin and penicillin V and G on *Tetrahymena*. I. Lethal effect and influence on multiplication. *Acta Protozool.*, 20, 175-182.
- Ricketts T. R. 1972: The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 19, 373-375.



Henryk REBANDEL

Toxic Action of Colistin and Penicillin V and G on *Tetrahymena*.  
III. Effects on Pairing for Conjugation

Received on 5 February 1981

*Synopsis.* The effect of antibiotics on phenomena of recognition, adhesion and fussion during conjugation in *Tetrahymena* indicated differences in the character of action between colistin and penicillins as well as between penicillin V and penicillin G. All antibiotics produced delayed costimulation period and had inhibiting influence on pairing dynamics. Colistin was about 100 times stronger than both penicillins in this respect. Preincubation with low concentrations of antibiotics before mixing of opposite mating types effected in the time-dependent way recovery of pairing level only for colistin and for penicillin V. Only colistin, administrated after costimulation period, stopped further adhesion; This effect was irrespective of concentration. Both kinds of penicillin, given both before and after fussion, blocked separation of exconjugants.

During conjugation in ciliated protozoan *Tetrahymena*, the phenomena of recognition, adhesion and fussion take place. This is considered as a model of the developmental process corresponding to differentiation in higher animals (Allewell 1976).

The induction of phenomena occurring during conjugation generally depends on complementary character of "mating types" and by blocking the possibility of cell fision after nutrient deprivation. The "transition point" called "initiation" (Bruns and Brussard 1974) or "division/differentiation decision" (Allewell 1976), takes place during first two hours of starvation, and only after this point the cell becomes "competent" for mating process.

Mixing of competent cells from complementary mating types induces RNA synthesis (Allewell and Wolfe 1977, Ron and Horowitz 1977), which results probably in synthesis of some unknown peptides which are active during adhesion and fussion. All these pre-pairing events are called "costimulation" (Bruns and Brussard 1974) and



they terminate during first hour after mixing of opposite mating types.

On the other hand, during starvation, cells liberate some "extra-cellular components" necessary for both costimulation and adhesion (A d a i r et al. 1978, W o l f e et al. 1979).

The adhesion leads to a solid structural bound between cells — the fussion, which takes place in about 5 h after mixing the mating types (O r i a s and H a m i l t o n 1979). All events during conjugation terminate in about 14 h after mixing of opposite mating types (B r u n s and B r u s s a r d 1974), that is manifested as disconnection of exconjugants. And so, the above presented process is characterized by a programmed sequence of physiological and membrane-dependent phenomena.

Basing upon recent studies on the action of colistin and two kinds of penicillin against *Tetrahymena*, their different effects on cell membrane and metabolism were postulated (R e b a n d e l et al. 1981, R e b a n d e l and K a r p i ń s k a 1981). The aim of present investigations was to study the effects of toxic action of colistin, penicillin V and penicillin G on the phenomena occurring during costimulation, adhesion and fussion in mating pairs of *Tetrahymena*.

### Material and Methods

The experiments were carried out on *Tetrahymena thermophila* strains CU-324 (mt IV) and CU-329 (mt II), inbred strain B, obtained from CBI in Copenhagen. The strains were cultivated separately at 30°C. on 1.5% proteose-peptone (Difco) with 0.1% of yeast extract (Difco) supplemented with mineral salts according to Plesner et al. (1964), without agitation. The system of trans-oculations preceding the experiments was the same as reported previously by R e b a n d e l et al. (1981). Since the experimental cultures were grown in 200 ml Ehrlenmayer flasks, in a volume 25 ml of the medium—the early stationary phase was obtained 72 h after inoculation. The experiments were carried out with the cells taken from 80-h cultures, using the standard Dryl's solution (D r y l 1959) as the basal starvation medium. The cells were washed in Dryl's solution by a four time centrifugation and then incubated overnight at 30°C (25 ml of cell suspension in Dryl's solution in 200 ml Ehrlenmayer flasks). The densities of cell suspensions were adjusted to  $2.5 \times 10^6$  cells/ml for each strain separately. Before each experiment the regularity of pairing process during 90 min after mixing of opposite mating types was controlled. The occurrence of less than 30% of cells in pairs in a sample was considered as negative, and these samples were not investigated. It was furthermore found that frequent sampling from one portion of the reacting cells disturbs the correct dynamics of pairing reaction. Basing on this observation, the suspension of mixed cells was divided into samples for single use immediately after mixing of the opposite mating types. 0.5 ml samples in three-depression slides were incubated in an incubator at 30°C.

Sulphate salt of colistin (Polfa), potassium salt of penicillin V (Polfa) and potassium salt of penicillin G (Polfa) were diluted in Dryl's solution and mixed



with cell suspension in ratio 1:1. Antibiotics were used in following final concentrations in mM/l: colistin —  $1.25 \times 10^{-1}$ ;  $6.25 \times 10^{-2}$ ;  $3.13 \times 10^{-2}$ ;  $1.56 \times 10^{-2}$ ;  $7.81 \times 10^{-3}$ ;  $3.91 \times 10^{-3}$ ;  $1.95 \times 10^{-3}$ ;  $9.75 \times 10^{-4}$ , penicillin V — 32; 16; 8; 4; 2; 1, penicillin G — 32; 16; 8; 4; 2; 1. It was simultaneously verified that the high drug concentrations used, lowered the ambient pH by less than 0.2 of pH.

The controls were treated in the same way as the experimentals, yet with Dryl's solution alone. The antibiotics were added either immediately after mixing of complementary mating types ("0" point), or at arbitrarily fixed time points before and after "0" point. Two different problems were investigated separately: (1) the dynamics of pairing reaction was estimated, when antibiotics were administered simultaneously to the "0" point, (2) prolonged effects of different time points of antibiotics administration on the level of pairs formed after 8 h of mating process were examined.

All experiments were repeated three times. The percentage of cells in pairs was established after fixing in formaldehyde, counting not less than 200 cells in each sample under the microscope.

## Results

(1) Pairing Dynamics between CU-324 and CU-329 Strains. As it is shown on Fig. 1, the high repeatability of pairing dynamics during the mating process reaching the level of 90% was obtained. The delay between the "0" point and the start point of pairing was always longer than

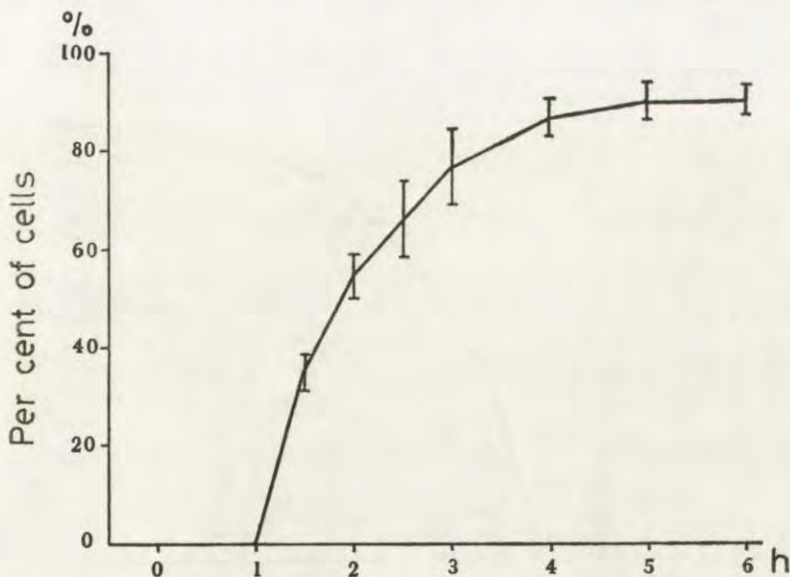


Fig. 1. The dynamics of control pairing reaction (with standard deviation) between CU-324 and CU-329 strains under experimental conditions in ten separate experiments. Abscissa: time in hours after mixing of opposite mating types, ordinate: percentage of pairing

one hour and shorter than 70 min. The obtained results allow a direct comparison of the different experiments.

(2) Administration of Antibiotics at the "0" Point. Concentrations totally blocking the mating process and without influence on pairing dynamics were in mM/l as follows: colistin —  $1.25 \times 10^{-1}$ ;  $9.75 \times 10^{-4}$ , penicillin V — 32; 1, penicillin G — 32; 1, respectively. The influence of different concentrations of colistin, penicillin V and penicillin G are shown on Figs. 2, 3 and 4 respectively. The following effects of antibiotic action were distinguished: delayed starting point of pairing (elongated costimulation period), concentration-dependent character of that delay and at last, the character of the following pairing dynamics during 6-h experiment. Both kinds of penicillin had the same concentration range of action and were 100–1000 times less active than colistin. All drugs produced elongation of costimulation period. Penicillin G had a stronger effect on the elongation of costimulation period than penicillin V, yet it showed a worse correlation between the drug concentration and lowered pairing dynamics. Only in colistin low concentration created

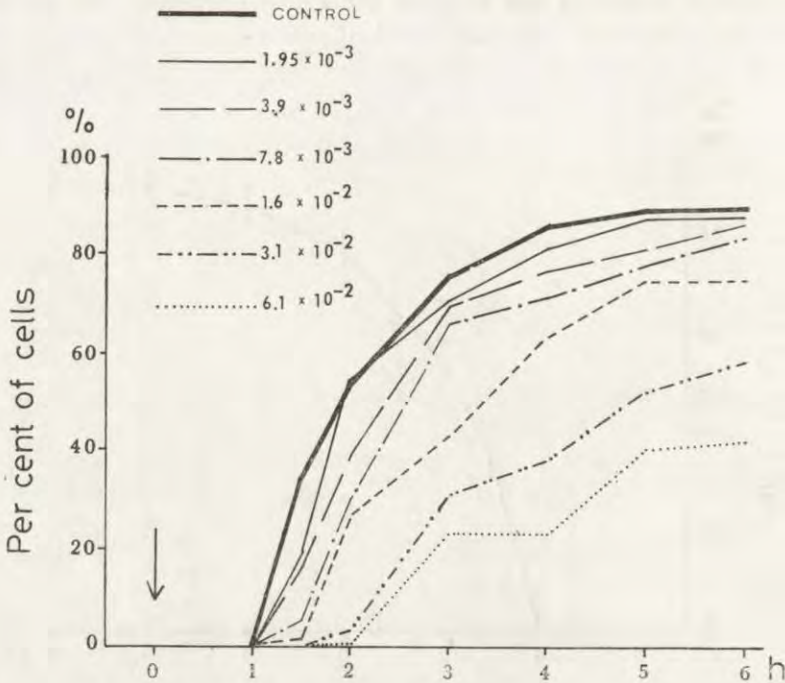


Fig. 2. Effects of different concentrations of colistin in mM/l on dynamics of pair formation. Abscissa: time in hours after mixing of opposite mating types, ordinate: percentage of pairing. Antibiotic or solvent were given at the "0" time (arrow)



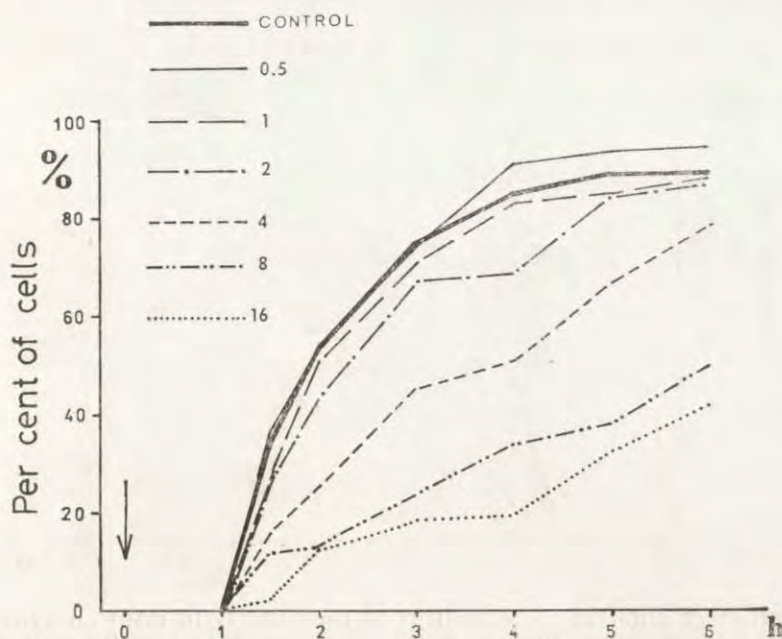


Fig. 3. Effects of different concentrations of penicillin V in mM/l on dynamics of pair formation. Abscissa: time in hours after mixing of opposite mating types, ordinate: percentage of pairing. Antibiotic or solvent were given at the "0" time (arrow)

a possibility of a complete renormalization of the pairing dynamics in spite of the initial elongation of the costimulation period.

(3) In separate experiments, antibiotics were added to the reacting cells at different time points: before (5 and 2 h) and after (2 h) mixing the complementary mating types, while administration of those drugs at "0" point was considered as control (Fig. 5). The percentage of cells in pairs was calculated 8 h after "0" point.

The influence of the antibiotics administration time on the level of pairing was ascertained: the effects depend on the drug, and — especially in the case of colistin — on its concentration. The results were analysed for two different time-intervals separately: (1) before the "0" point and (2) after the "0" point. In the second case, antibiotics were administered at that time-point where the control showed about 50% of pairs (see Fig. 1). Whenever the cells were preincubated with antibiotics, two different effects were obtained. In higher concentrations, the stronger was the inhibitory effect of the drug on pairing, the longer was the time before "0" point, during which the cells were in contact with that compound. In lower concentrations, the reaction of adaptation-type was

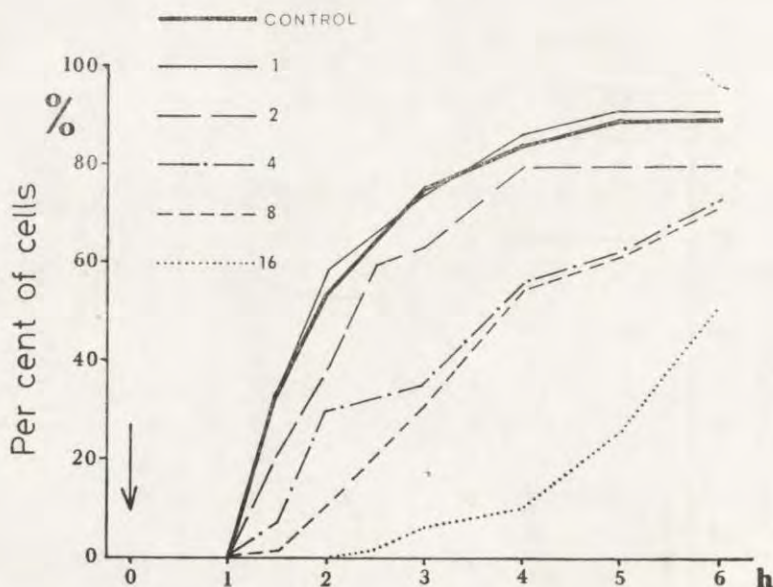


Fig. 4. Effect of different concentrations of penicillin G in mM/l on dynamics of pair formation. Abscissa: time in hours after mixing of opposite mating types, ordinate: percentage of pairing. Antibiotics or solvent were given at the "0" time (arrow)

obtained for colistin and for penicillin V, as a result of a 5-h preincubation. The effect of penicillin G, on the other hand, seems to be independent of the time of preincubation. When antibiotics were added to the cells 2 h after "0" point, blocking of the pairing process at a given level of pairing, irrespective of concentration, was obtained only for colistin. For penicillin V given 2 h after the "0" point, the effect of concentration was similar to preincubation effects and was more distinct than that for penicillin G. In the highest concentrations of all antibiotics administered both before and in the "0" point — they completely block the pairing reaction, drugs being given during the pairing process cause not only blocking of further pairing but also desintegration of the pairs mated earlier. This effect was the weakest for colistin and the strongest for penicillin G.

(4) The experiment in which colistin and penicillin V were added to the cell suspension at "0" point or 8 h later (after cell fussion), and the paired cells were scored 20 h after "0" point.

The results for one, selected concentration of each drug are shown on Fig. 6. The demonstrated character of differences was typical for whole range of the tested concentrations. The number of paired cells



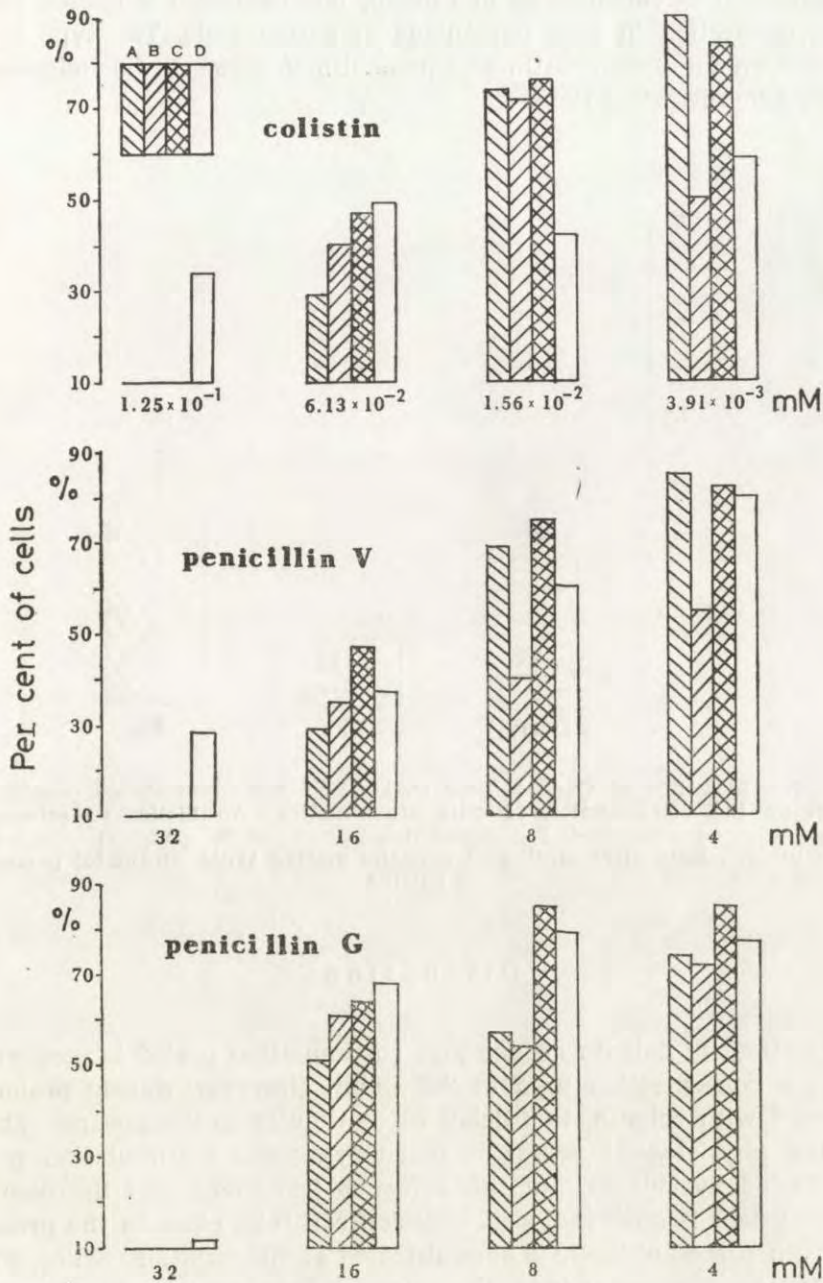


Fig. 5. The levels of pairing obtained after 8 h of conjugation in the presence of antibiotics in selected but representative concentrations given before, at, and after the "0" point (the time point for mixing of opposite mating types). Antibiotics were administrated: A — 5 h before "0" point, B — 2 h before "0" point, C — at "0" point, D — 2 h after, "0" point. Ordinate: percentage of pairing

was low both in colistin and in control, but penicillin V caused longer lasting connection in high percentage of paired cells. The type of the cell reaction for both colistin and penicillin V seems to be independent of their administration time.

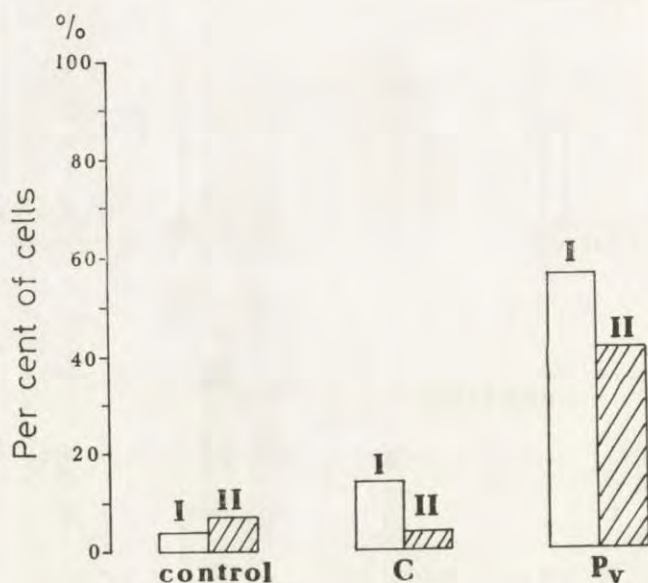


Fig. 6. The influence of C — colistin ( $3.91 \times 10^{-3}$  mM) and P<sub>v</sub> — penicillin V (4 mM) on the disconnection of cells after mating. Antibiotics or solvent (in controls) were administrated: I — simultaneously to the "0" point, II — 8 h later. Results in 20th hour after mixing of opposite mating types. Ordinate: percentage of pairing

## Discussion

The effect of colistin on delay of costimulation period is proportional to the concentration used at "0" point. However, during prolonged treatment with colistin, this delay of costimulation disappears. Therefore the physiological processes underlying the costimulation period are affected by colistin, but this effect is transient, and the recovery of this system is observed. Cell adhesion can take place in the presence of colistin if the antibiotic is administrated at "0" point or earlier, which indicates an adaptation-type character of that process. On the other hand, the adhesion is blocked when the antibiotic is administrated after the termination of costimulation, it means, after the raise of RNA synthesis. Moreover, colistin seems not to affect the pair separation pro-



cess, regardless, whether it was administrated before or after the cell fussion.

Penicillin V showed similar influence on costimulation to colistin, however with no effect on adhesion and, probably, fussion. On the other hand, it seems that penicillin V blocks the mechanism of pair disconnection, similarly to penicillin G (Rebandel — unpublished). Presumably, in penicillins, only the pairs effectively conjugating (in which fussion took place) stayed permanently connected.

The comparison of results of experiments with penicillin V and penicillin G shows that the difference in chemical constitution of these drugs is sufficient to produce some different biological effects in animal cell. This conclusion, confirmed also by the results of Rebandel et al. (1981) and of Rebandel and Karpińska (1981), opposes to the commonly recognized opinion. This latter is, that a higher acid resistance of penicillin V over penicillin G is the only effect of the difference in their chemical constitution, without distinct differences in their action on bacteria as well as on the animals (Auslander et al. 1973, Bird and Nayler 1971, Bond and Lightbown 1966, Charles 1954, Goldstein et al. 1969, Kessel 1966, Kuryłowicz 1979, Moya 1966 and many others).

The toxicity of penicillin and colistin obtained in experiments are about 100 and 1000 times lower (respectively) for *Tetrahymena* (Rebandel et al. 1981, Rebandel and Karpińska 1981) than that obtained for sensitive bacterial strains and seems to be comparable with the toxicity of these antibiotics for mammals (Korzybski et al. 1977, Kuryłowicz 1979).

It is concluded that different modes of action of these antibiotics on *Tetrahymena* sexual behavior used as the model of differentiating animal cell, may serve us useful tool in pharmacological assay. Therefore, it is possible that by this kind of study the cellular basis of side-effects of different drugs can be evidenced.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank dr. Janina Kaczanowska and prof. Stanisław Dryl for helpful suggestions during preparation of the manuscript. This work was supported by M.R.II. from Polish Academy of Sciences.

#### REFERENCES

- Adair W. S., Baker R., Turner R. S. and Wolfe J. 1978: Demonstration of a cell-free factor involved in cell interaction during mating in *Tetrahymena*. *Nature*, 274, 54-55.

- Allewell N. M., Oles J. and Wolfe J. 1976: A physiochemical analysis of conjugation in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.*, 97, 394-405.
- Allewell N. M. and Wolfe J. 1977: A kinetic analysis of the memory of a developmental mating interactions in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.*, 109, 15-25.
- Auslander D. E., Felmeister A., Sciarrone B. J. and Segelman A. B. 1973: Proposed mechanism for gentamycin transport. *J. Pharm. Sci.*, 62, 167.
- Bird A. E. and Nayler H. C. 1971: Design of penicillins. In: *Drug Design*. (ed. Ariens E. J.) Academic Press, New York, London, 11, 277.
- Bond J. M. and Lightgown J. W. 1966: Metabolism of certain penicillins in blood, urine and bile. In: *Antibiotics — Advances in Research, Production and Clinical Use*. Butterworths Ltd., London, 179.
- Bruns P. J. and Brussard T. B. 1974: Pair formation in *Tetrahymena pyriformis*, an inductible developmental system. *J. Exp. Zool.*, 188, 337-344.
- Charles D. 1954: Placental transmission of antibiotics. *Obstet. Gyneacol. Brit. Emp.*, 61, 750.
- Dryl S. 1959: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. *J. Protozool.*, 6, (suppl.), 25.
- Goldstein A., Aronow L. and Kalman S. M. 1969: *Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology*. Harper Row Publishers, New York, Evanston and London.
- Kessel R. W. J. 1965-1966: Penetration of chemotherapeutic agents into cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1035.
- Kuryłowicz W. (ed.) 1979: *Antybiotyki, Aktualny Stan Wiedzy. PZWL*.
- Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z. and Kuryłowicz W. 1977: *Antybiotyki: Pochodzenie, Rodzaje, Właściwości. PZWL, Vol. I, II*.
- Moya F. 1965-1966: Mechanism of drug transfer across the placenta with particular reference to chemotherapeutic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1051.
- Orias E. and Hamilton E. P. 1979: Cytogamy: an inductible, alternate pathway of conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics*, 91, 657-671.
- Plesner P., Rasmussen L. and Zeuthen E. 1964: Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. (ed. Zeuthen E.) In: *Synchrony in Cell Division and Growth*. Interscience Publ., New York, London, Sydney, 543-564.
- Rebandel H., Gierczak A. and Karpińska A. 1981: Toxic action of colistin and penicillin V and G on *Tetrahymena*. I. Lethal effect and influence on multiplication. *Acta Protozool.*, 20, 176-182.
- Rebandel H. and Karpińska A. 1981: Toxic action of colistin and penicillin V and G on *Tetrahymena*. II. Inhibition of phagocytic activity. *Acta Protozool.*, 20, 291-298.
- Ron A. and Horowitz O. 1977: Increased RNA synthesis during pre-conjugation and its effects on pair formation in *Tetrahymena*. *Experientia*, 33, 1146-1149.
- Wolfe J., Turner R. S., Baker Jr. R. and Adair W. S. 1979: The need for an extracellular component for cell pairing in *Tetrahymena*. *Exp. Cell Res.*, 121, 27-30.



Leszek SZABLEWSKI

The Effect of Selected Antibiotics on *Tetrahymena pyriformis*

Received on 6 January 1981

**Synopsis.** Colistin and penicillin G and V inhibit the rate of cell multiplication, decrease the moving speed and cause elipsoidal deformation of cell shape with simultaneous shortening of the cell length in *Tetrahymena pyriformis*. Colistin showed above mentioned effects at much lower concentrations than both penicillins which are characterized by rather similar cytopathological action. Penicillin potassium salts proved to be more effective biologically than antibiotics in the form of free acid.

The behaviour of pro- and eucariotic cells treated with drugs was the subject of many elaborations. Among other things, morphological changes in *Protozoa* caused by antibiotics (N é m e t h and C s i k 1961) were examined. Further on, the mechanism of disturbances in proteins biosynthesis in ciliates treated with actinomycin D and cycloheximide (F r a n k e l 1965, 1969 and 1970) was explained.

Penicillins and polymyxins are antibiotics commonly used in medicine. Moreover, the mechanism of action against bacteria and tissues cells of these antibiotics was learnt about in details. Penicillins inhibit the biosynthesis of cell wall in bacteria, polymyxins on the other hand increase the cell membrane. It is, however, little known about the way ciliata react to a long-lasting contact with the above mentioned antibiotics. Despite this, in many laboratories penicillin (of low concentration) is, for instance, added to ciliates cultures in order to cause their axenization and prevent bacterial infections. It is assumed that small doses of antibiotics used in the experiments do not cause essential changes in the morphology or physiology of cells.

The aim of the experiments was to examine effect of penicillin G and penicillin V (both as potassium salts) and colistin as sulphate in subtoxic and toxic concentrations on the multiplication rate (expressed in

the quantitative increase of the population), moving speed and morphology of ciliata. This choice of antibiotics allows to answer to the question: what is the effect on the above mentioned morphophysiological parameters dependent on? Is the stronger or weaker effect caused by the action of antibiotics (cell wall in the case of penicillin and cell membrane in the case of colistin) or by the kind of penicillin.

### Materials and Methods

The experiments were carried out on *Tetrahymena pyriformis*. Ciliata were breded on a medium (1.5% proteoso-peptone with addition of 0.1% of yeast extract) at dark, at 28°C under sterile conditions. Ciliates with the limited rate of growth caused by the reduction of oxygen were used in the experiments. This type of culture was obtained by ooculating the cells on the medium in the vertically arranged test tubes of a diameter 16 mm, and medium volume 5 ml. This is connected with the character of experiments which were to explain the effect of a long-lasting contact of ciliates with the antibiotic. For this type of culture causing the lowering of the level and rate of metabolism, the antibiotics stay for a longer time in the environment maintaining their properties. The test with naive cells confirmed these hypothesis. The control cultures were breded at little alkaline pH. The additions of the antibiotic (Table 1) did not change the medium pH in a significant way (Table 2) (compare the results of control experiments with penicillin V — free acid).

Table 1

Properties of the tested antibiotics

Antibiotic	Molecular mass (in grammes)	Units/mg
Penicillin V (salt K <sup>+</sup> )	388.51	1510
Penicillin V (free acid)	350.42	1630
Penicillin G (salt K <sup>+</sup> )	372.51	1614
Colistin (sulphate)	1400.00	18109

Table 2

Changes of medium pH after administering the antibiotic

Specification	Antibiotic concentration in mM/1	pH
Control		7.14
Penicillin V (salt K <sup>+</sup> )	128	7.00
Penicillin G (salt K <sup>+</sup> )	128	7.00
Colistin (sulphate)	32	6.60



The moment of adding the antibiotic (described as "0" point) was assumed as the beginning of the experiment. The culture density was then about 30 000 cells/ml. Samples for testing were taken every 24 h.

All calculations of significance of differences were made by the method of analysis of variance using "Two way ANOVA with replication" according to Sokal and Rohlf (1969) with the significance level 5%.

#### The Detail Description of the Methodology Used in Particular Experiments

##### (1) Examination of Multiplication Rate

The cells were counted at each time-point (0 h, 24th h, 48th h, etc.) in a volume 0.1 ml, coming from a 100-time diluted sample of a capacity 0.1 ml of each experimental culture. The density of ciliates at "0" point of each culture was taken as a unit (Fig. 1). The approximate time of cell reduplication (A.T.C.R.)

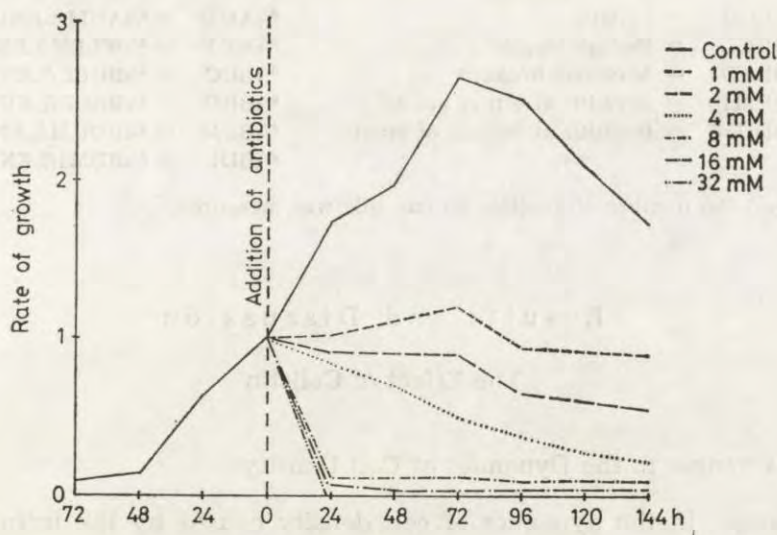


Fig. 1. Change of *Tetrahymena pyriformis* cells density depending on the concentration of colistin

during the first 24 h of the experiment was calculated using the following formula:  $A.T.C.R. = \frac{24 \text{ h}}{(A-1)}$ , where A is the density ratio after 24 h.

##### (2) Examination of Moving Speed

The experiments were carried out in a 1 ml camera. The medium-layer thickness was 1 mm which rendered possible free motion of cells. Before the motion was recorded, ciliates stayed in the camera for about 5 min then, periodical,

5-second recordings of the motion by the photographic method according to Dryl (1958) were taken. The length of covered paths was measured from the negative on the microfilm of Carl-Zeiss reader screen.

### (3) Examination of Morphological Properties

Morphological features of ciliates treated with antibiotics of different concentration for 144 h were examined. They are compared to ciliates in the beginning moment of the experiment ("0" point) and after 144 h of control culture (with no antibiotic administered). The preparations were made by the Chatton-Lwoff's method modified by Frankel and Heckmann (1968). The measurements were taken in accordance with the system and nomenclature proposed by Taylor et al. (1976). The following values were measured:

A-M1	= Distance between edge and beginning of M1	$\%AWD = \%BDM1/BDUM$
A-UM	= Distance between edge and end of UM	$\%PWI = \%BRED/BDUM$
WLEN	= Distance between edge and widest point	$\%AM1 = \%A-M1/LENG$
LENG	= Length	$\%AUM = \%AUM/LENG$
BUCL	= Buccal length	$\%WLN = \%WLEN/LENG$
BRED	= Maximal breadth	$\%BUC = \%BUCL/LENG$
BDM1	= Breadth at top of mouth	$\%BRD = \%BRED/LENG$
BDUM	= Breadth at bottom of mouth	$\%BDM = \%BDUM/LENG$
		$\%BD1 = \%BDM1/LENG$

Moreover, the number of kineties on one side was measured.

## Results and Discussion

### The Effect of Colistin

#### (1) Changes in the Dynamics of Cell Density

Changes in the dynamics of cell density caused by the influence of colistin have been shown in Fig. 1. A considerable decrease in density of ciliates, as compared to the control results, with the increase of antibiotic concentration is seen here. Only in the case of 1 mM concentration, on inconsiderable quantitative increase of the population during the first 72 h of the experiment is observed. For all the remaining concentrations, the number of cells is lower than at "0" point. Basing upon the carried, out analysis of variances we arrive to a conclusion that each of the used concentrations inhibit the multiplication of the examined cells as compared to the control at the statistically significant level. Also effect of particular concentrations of antibiotic on multipli-



cation rate has been ascertained. The ascertained differences are significant. Only between antibiotic concentration 1 mM and 2 mM as well as 2 mM and 4 mM, statistically insignificant differences were ascertained.

On the other hand, no approximate cell reduplication time could be calculated since each of the used concentrations lowered the culture density with regard to "0" point or stayed at the same level, during the first 24 h of the experiment (see Fig. 1). The maximum cell density which was obtained with regard to "0" point for particular antibiotic concentrations was as follows: for 1 mM — 1.2, for 2 mM — 0.9, for 4 mM — 0.8, for 8 mM — 0.1 and for 16 mM — 0.009.

## (2) The Effect of Colistin on the Moving Speed of *Tetrahymena*

The changes in the moving speed of *Tetrahymena* were caused by the added antibiotic (Fig. 2). A distant speed decrease of ciliates subjected to the action of colistin is seen here. These differences, as compared with the control samples, are statistically significant. The expe-

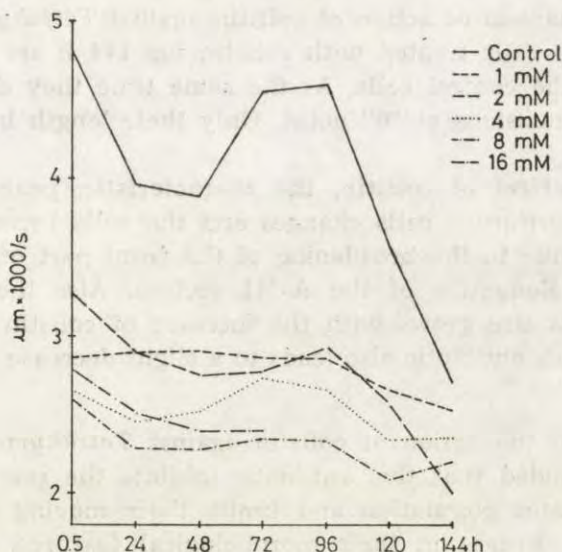


Fig. 2. Change of the moving speed of *Tetrahymena pyriformis* cells depending on the concentration of colistin

periments also prove that with the growth of antibiotic concentration the cell moving speed decreases. Upon the comparison of cell speeds in different antibiotic concentrations we see that almost in all cases statistic-



ally significant differences occur (with the exception of *Tetrahymena* moving speeds at concentrations 1 and 2 mM where statistically insignificant differences were noted). It was impossible to check the ciliates moving speed at concentration 16 mM after 96, 120 and 144 h, due to too little cell number. For the concentration 32 mM, on the other hand, the measurement could be taken only for 0.5 h point (this value is 2660  $\mu\text{m}$ ), as this concentration caused the death of 100% of cells after 24 h.

### (3) The Effect of Colistin on Morphological Parameters

The changes of morphological and morphometric parameters after 144 h of cultivation in lower colistin concentrations (from 1 to 8 mM) were shown in Table 3. During that period of time, cells dimensions increased and some proportions changed in the group of control ciliates cultivated without antibiotic. The changes caused as a result of adding colistin to the culture are not so clear in the case of multiplication. Small differences depending on colistin concentration were noted in the case of e.g., %BUC, %AWD, %AUM and %AM1. These changes, however, are too small to be the basis upon which conclusions can be drawn about the mechanism of action of colistin against *Tetrahymena*. The dimensions of the cells treated with colistin for 144 h are much smaller than those of the control cells. At the same time they differ insignificantly from dimensions at "0" point. Only their length became slightly reduced.

Under the effect of colistin, the characteristic, pear-like shape of *Tetrahymena pyriformis* cells changes and the cells become more ellipsoidal. This is due to the broadening of the front part of the cell (near cytostome) and elongation of the A-M1 section. Also the cytostome is elongated, as its size grows with the increase of colistin concentration. The action of this antibiotic also leads to a slight decrease of the number of kineties.

Summing up the action of colistin against *Tetrahymena pyriformis* it can be concluded that this antibiotic inhibits the rate of growth in number of ciliates population and limits their moving speed. It also causes certain changes in their morphological features. Morphological changes do not, on the whole, depend on the antibiotic concentration.

The obtained results show that colistin, as in the case of bacterial cells (Sebek 1967) acts against the cell membrane of the examined ciliates. The ascertained decrease of the dynamics of density caused by the elongated generation time (this was observed in the course of complementary experiments on isolated cells), reduced moving speed of the cells, and morphological changes seem to confirm the above mentioned



supposition. Owing to the detergent-like properties of colistin, a free outflow of substrates from the cell caused by the increased cell membrane permeability takes place. This results in a shortage or lack of the components necessary for its structure. On the other hand it is known that colistin reacts with cytoplasmic membrane causing irreversible changes in its structure. This would explain the lowering of the dynamics of density as well as the observed morphological changes. The increased cell membrane permeability causes that osmoregulatory mechanism is disturbed, eventually changing the cell shape. Ion equilibrium disturbances result in a change of the moving speed of incubated tetrahymena with the addition of colistin as compared with the control cells. It is also known that polymyxins do not permit easily to the cell inside (Jawetz 1970). This fact can also confirm the action of colistin against the cell membrane of ciliates.

The presented results show that colistin causes functional changes in the cell membrane. However, we are lacking the data on the structural changes of the cell membrane in ciliates.

#### The Effect of Penicillin G (salt $K^+$ ) and Penicillin V (salt $K^+$ )

##### (1) Changes in the Dynamics of Population Density

The changes in the number of ciliates under the effect of both penicillins are shown in Fig. 3. A considerable decrease in number of ex-

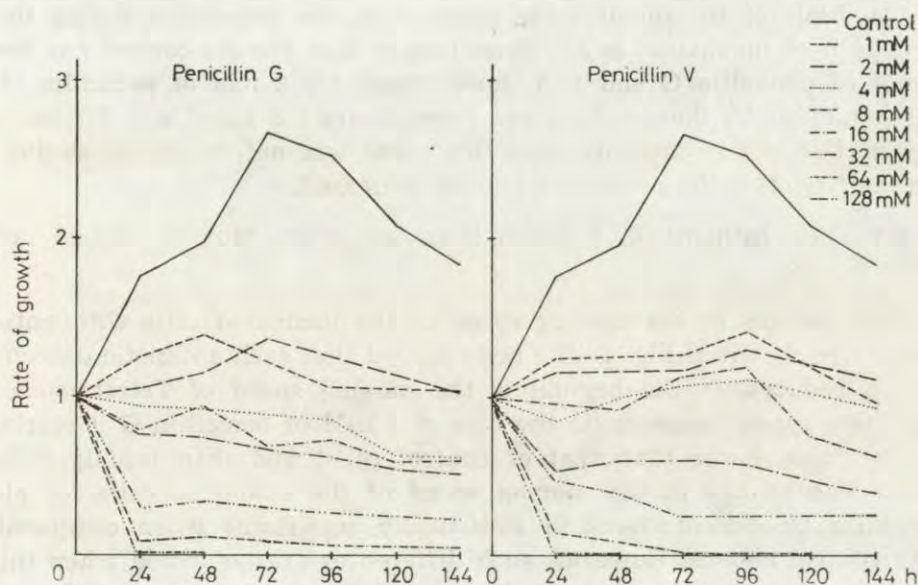


Fig. 3. Change of *Tetrahymena pyriformis* cells density depending on the concentration and kind of penicillin



aminated ciliates as compared with the number of control population is noted. In the case of action of penicillin G in a concentration 1 and 2 mM and penicillin V in concentration 1, 2, 4 and 8 mM a slight quantitative increase of ciliates is noted followed then by their decrease. The maximum density is obtained earlier in the population of ciliates treated with penicillin G and then in the population treated with penicillin V. Higher concentrations (from 4 mM) in the case of penicillin G, and 16 mM in the case of penicillin V cause a rapid quantitative decrease of the examined populations. However, concentrations above 32 mM are strongly toxic since the number of the cells falls below 50% of the initial amount. After adding penicillin G to the culture, the dynamics of density in all concentrations differ from that in the control in a statistically significant level. However, the lack of essential differences in the dynamics of density of particular populations cultivated in different concentrations of this antibiotic is sporadically noted. Statistical differences in the density of incubated cells with the addition of 1 and 2 mM penicillin G, 4 and 8 mM, 4 and 16 mM as well as 8 and 16 mM are insignificant. After adding penicillin V, also the dynamics of density in all concentrations differs from that in the control in a statistically significant level. However, we do not ascertain such differences between the density of the populations incubated in the presence of 1, 2, 4 and 8 mM of the antibiotic. The estimated time of reduplication of the cells calculated on the basis of the quantitative increase of the population during the first 24 h of incubation is 3.5 times longer than for the control one for 1 mM of penicillin G and 11.5 times longer for 2 mM of penicillin G. For penicillin V, these values are respectively 3.8 times and 6.6 times higher. For higher concentrations this value was not calculated as during the first 24 h the number of ciliates decreased.

## (2) The Influence of Penicillins on the Moving Speed of *Tetrahymena*

The changes in the moving speed of the incubated cells with antibiotics are shown in Fig. 4. The tests proved that each antibiotic concentration reduces, at the beginning, the moving speed of *Tetrahymena*. Then this speed increases (in the case of 1 mM of penicillin G it reaches the value lower than that of control cells) and then rapidly falls down. The change in the moving speed of the examined cells for all penicillin G concentrations is statistically significant when compared with control ciliates. However, such differences are not noted when the moving speed of the cells is studied in relation to the concentration of antibiotic. After adding penicillin V, irrespective of the concentration,



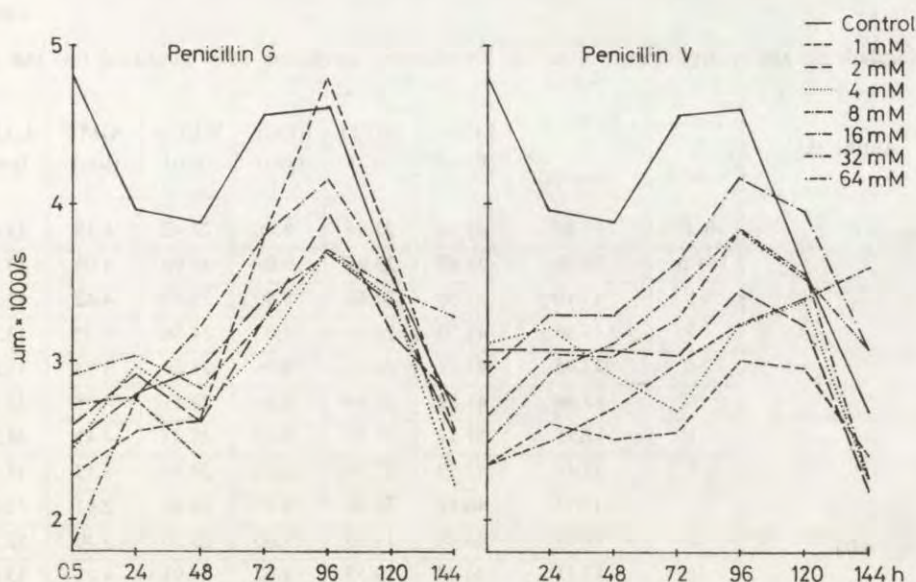


Fig. 4. Change of the moving speed of *Tetrahymena pyriformis* depending on the kind of penicillin and its concentration

the moving speed of the cells is always statistically different as compared to that of control cells. The same differences occur also between the moving speed of the incubated tetrahymena with the addition of 1 mM and other concentrations of antibiotic. This parameter also differs statistically between the cells to which 16 mM of antibiotic and any other were added. The moving speeds of the incubated cells with the addition of the remaining antibiotic concentrations do not differ between each other in a statistically significant level.

### (3) The Effect of Penicillin on Morphological Parameters

The morphological and morphometric changes caused by adding the antibiotic to the culture are shown in Table 3. The length of the cells treated with penicillin G for 144 h is smaller than that of control cells. For low concentrations (1 and 2 mM) the cells are little longer than at the beginning of the experiment. For concentrations from 4 to 32 mM, the length of the cells is similar to that of the initial cells, and for 64 mM concentration — a little bit longer. For low concentrations (1–4 mM) the cell width does not differ basically from the width of the input cells, for 8 and 16 mM concentrations — the width decreases and for 32 and 64 mM concentrations the cell width increases mostly in the highest concentration.

Table 3

Morphologic and morphometric data on *Tetrahymena pyriformis* cells incubated for 144 h in

Antibiotic	Conc. in mM/1	Number of kineties	LENG ( $\mu\text{m}$ )	BRED ( $\mu\text{m}$ )	BUCL ( $\mu\text{m}$ )	WLEN ( $\mu\text{m}$ )	A-M1 ( $\mu\text{m}$ )	A-UM ( $\mu\text{m}$ )
Control	0 h	17.65	45.58	23.84	8.68	27.42	4.35	13.03
	144 h	18.00	55.67	29.95	9.08	33.95	4.60	13.81
Colistin	1	17.19	43.56	24.44	8.80	25.15	4.42	13.23
	2	17.86	42.10	22.68	9.03	24.76	4.15	13.18
	4	17.05	41.09	21.65	9.06	23.89	3.94	13.02
	8	17.46	41.82	22.80	9.45	24.51	4.05	13.51
Penicillin G (K <sup>+</sup> salt)	1	17.55	51.41	21.69	9.80	27.31	4.41	14.23
	2	17.48	47.89	23.36	10.13	24.81	3.13	13.31
	4	17.73	46.11	22.50	9.37	24.62	2.81	12.20
	8	17.25	46.48	19.60	9.00	25.30	3.70	12.75
	16	17.51	44.48	19.53	9.62	24.91	4.01	13.65
	32	17.55	44.95	26.69	9.67	24.93	3.85	13.51
	64	17.96	48.66	35.83	9.48	26.64	3.55	13.05
	1	16.57	44.30	18.35	9.61	23.72	3.83	13.46
Penicillin V (K <sup>+</sup> salt)	2	16.40	44.03	15.78	9.35	22.15	4.72	14.10
	4	16.90	44.95	15.58	9.38	22.63	4.53	13.87
	8	16.96	44.84	19.92	9.51	22.33	4.10	13.58
	16	17.28	48.71	23.75	9.36	23.84	3.62	12.96
	32	17.23	44.38	20.30	9.37	22.71	3.43	12.51

Under the effect of penicillin G, the proportions and shapes of the cells change. The A-M1 section grows wider and becomes shorter in concentrations 2 and 4 mM. Also cytostome is elongated. The cell loses its pear-shape and at the concentration 1 mM, BRED is almost in the middle of its length. The cell becomes elipsoidal. In concentrations from 2 to 16 mM, the cell shape undergoes a gradual, though incomplete, normalization. At the same time, in concentrations from 1 to 16 mM, the value of %BRD changes. In the remaining concentrations a rapid increase in the cell width and changes in the proportions are noted.

Penicillin G has slight effect on the change in the number of kineties.

The length and width of the cells, subjected to the action of penicillin V for 144 h are lower than those of control cells. At the same time, their length is similar to the cell length at the beginning of the experiment, and their width seems to be correlated with the antibiotic concentration. Only for concentrations 16 and 32 mM, a slight increase of cell width is noted.



different concentrations of colistin, penicillin G (potassium salt) and penicillin V (potassium salt)

BDM1 ( $\mu\text{m}$ )	BDUM ( $\mu\text{m}$ )	%AWD	%PWI	%AM1	%AUM	% WLEN	%BUC	%BRD	%BDM	%BDI
9.37	17.97	51.38	137.55	9.54	28.67	60.18	19.08	52.12	38.56	20.44
11.98	22.85	51.85	139.56	8.09	24.37	60.60	16.25	54.23	39.90	20.58
13.22	20.41	64.59	123.49	10.20	30.52	57.77	20.39	56.18	46.94	30.33
11.75	19.06	62.06	119.83	9.70	30.87	61.02	21.64	54.18	45.49	28.39
11.06	17.95	61.97	123.26	9.58	31.89	58.19	22.30	53.06	43.13	26.80
10.69	18.67	57.04	121.27	10.12	32.98	58.46	23.63	55.00	45.68	25.67
6.77	17.31	62.84	128.25	8.35	27.21	51.92	17.96	41.42	33.03	20.69
8.78	18.83	48.20	126.96	6.61	28.27	52.42	21.50	49.66	39.96	18.48
8.28	17.10	48.46	133.73	6.11	26.64	53.49	20.47	48.21	37.94	17.87
8.83	15.16	58.30	131.07	8.01	27.74	54.31	20.13	42.41	32.81	19.08
9.26	15.15	63.55	137.85	9.06	30.89	56.00	21.80	44.71	33.45	20.93
11.64	20.63	56.36	129.87	8.49	30.24	55.49	21.69	59.56	46.02	25.97
15.10	27.68	53.70	130.31	7.36	27.19	54.85	19.80	73.35	56.88	31.06
8.56	15.18	57.79	120.45	8.69	30.59	52.94	21.84	41.42	34.54	19.40
8.18	13.25	61.77	117.58	10.67	32.13	50.27	20.97	36.07	30.25	18.70
7.81	12.76	61.89	123.98	10.88	31.13	50.30	20.94	34.88	28.57	17.38
8.63	15.86	54.64	126.18	9.27	30.67	49.92	21.36	44.54	35.46	19.28
11.31	19.61	57.61	122.46	7.44	26.81	48.87	19.33	48.85	41.15	23.22
7.81	15.87	48.87	128.21	7.74	29.21	51.17	21.43	46.11	36.05	17.36

Under the influence of penicillin V, the proportions and shape of the cell change. The front section is slightly widened in the case of concentrations from 1 to 4 mM and elongated in the case of concentrations from 1 to 8 mM. For higher concentrations, the value A-M1 decreases. The value of %BUC, on the other hand, increases with the strongest effect being noted for 1 mM concentration of the antibiotic. The cell loses its pear-shape and, beginning from the lowest concentration, BRED is found close to the middle of its length. The value of %BRD considerably changes. However, for concentrations from 8 to 32 mM, this tendency is reverted and the body width increases, yet not reaching the values characteristic for control cells. The increase of the deformation caused by the action of high concentrations of penicillin V is much lower than in the case of penicillin G. The action of this antibiotic leads to a considerable decrease of the number of kineties.

Summing up the action of penicillin on *Tetrahymena pyriformis* we



can conclude that these antibiotics change the rate of growth in density of the population, inhibit the moving speed of ciliates (especially in the initial phase of the experiment) and cause morphological changes in the cells. It is supposed that these antibiotics act against the cytoplasmic membrane of the cells sensitive to penicillins (Rogers 1971). Basically, however, they inhibit the synthesis of the cell wall in bacteria. The observed physiological changes in ciliates, at the beginning of the experiment, seems to confirm the analogous character of action of penicillins to that in bacteria. These antibiotics show the strongest bactericidal action in the phase of an intensive cell growth when the cell wall is being built.

A strong influence on the examined morphophysiological parameters of *Tetrahymena* is exerted by potassium ion administered together with the antibiotic. This cation effects all the examined features. It decreases the dynamics of density and moving speed of the cells. It should be understood that for lower antibiotic concentrations the dominating influence on the change of the examined physiological parameters is exerted by potassium. This supposition was confirmed with the use of penicillin V (free acid) in concentrations 1, 2 and 3 mM (higher concentrations were not obtained due to weak solubility of this antibiotic in water). In the case of 1 and 2 mM concentrations of this antibiotic, the differences in the density of culture of the examined samples and the cell moving speed did not differ from those of the control cells in a statistically significant way. However, these differences appeared after adding 3 mM of penicillin V (free acid) to the culture and in each of the examined concentrations of penicillin V (potassium salt).

In higher concentrations of penicillins, the inhibiting action is caused both by the antibiotic and the ion. The complementary experiments show that the introduction of cation  $K^+$  reduces the density of ciliates as compared to the control cells by 8.02% in a concentration 8 mM and by 51.2% in a concentration 64 mM. It seems that alike in the case of bacteria, the culture phase also affects the action of the antibiotic.

Németh and Csik (1961) observed the stimulating effect of crystalline penicillin on the multiplication rate of *Tetrahymena pyriformis* after adding 500 and 1000 units of this antibiotic to the medium. These values would correspond to 0.8 and 1.6 mM concentrations of penicillin G (potassium salt) respectively. The multiplication rate in the first concentration was not tested and the culture density in 1 and 2 mM concentrations was lower than that of the control cells. Therefore it can be understood that the causing factor of above mentioned changes may depend on different sensitivity of ciliates to antibiotics during various culture phases.



On the other hand, it does not seem that the observed morphophysiological changes depend on the change of the medium pH caused by adding the antibiotic. The addition of penicillin V (free acid) to the culture does not affect the change of the examined morphophysiological parameters though 3 mM of this antibiotic lowers the medium pH to 6.83.

### General Discussion

The obtained results show that the examined antibiotics affect in a different way the ciliates. The reaction of *Tetrahymena pyriformis* is stronger when it contacts colistin than when contacts both kinds of penicillin. On the other hand, the general character of changes (especially physiological ones) caused by penicillins is similar to the changes caused by colistin. However, in order to obtain similar effect in the case of penicillins as observed after adding colistin we have to apply much stronger concentrations of both penicillins. A similar dependence was ascertained also by other authors. Rebandel et al. (1981) examining the toxicity of colistin and both penicillins expressed in LD-50 (lethal dose 50%) showed that, depending on the kind of medium used, colistin was 2.5 to 400 times stronger than the examined penicillins. The stronger action of colistin against *Tetrahymena pyriformis* can result from the presence of a structure (cell membrane) in the cell which is affected by this antibiotic. Penicillins, on the other hand, inhibit the synthesis of the cell wall which is not found in the examined ciliates. All the examined morphophysiological features, depend on the correct structure and function of the cell membrane which has been violated after adding colistin. It seems that we can expect more substantial changes examining the effect of penicillins on cytoplasmic structures of these antibiotics permit to the cell inside more easily than colistin (Kuryłowicz 1979).

The obtained results show that the cell reaction depends, to a small extent, on the kind of penicillin (penicillin G or penicillin V). On the other hand, changes caused by these drugs in the form of salts are more essential than the changes caused by these drugs in the form of free acid. This can be explained by a toxic action of the introduced potassium ion, as well as other properties of the antibiotic in the form of salt. The antibiotics in the form of salt differ basically in their therapeutic action from free acid. The complementary experiments with penicillin G in the form of sodium salt showed weaker morphophysiological changes than after adding this antibiotic in the form potassium salt to the culture.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks Prof. Dr. S. Dryl and Doc. Dr. S. L. Kazubski for valuable comments and help in preparation of manuscript, and also Mrs. B. Oleszczak for excellent technical assistance. This work was supported by national grant PAN II.

## REFERENCES

- Dryl S. 1958: Photographic registration of movement of *Protozoa*. Bull. Acad. Pol. Sci. II Ser. Sci. Biol., 6, 429-430.
- Frankel J. 1965: The effect of nucleic acid antagonists on cell division and oral organelle development in *Tetrahymena pyriformis*. J. Exp. Zool. 159, 113-147.
- Frankel J. 1969: The relationship of protein synthesis to cell division and oral development in synchronized *Tetrahymena pyriformis* GL-C: An analysis employing cycloheximide. J. Cell. Physiol., 74, 135-149.
- Frankel J. 1970: An analysis of the recovery of *Tetrahymena* from effects of cycloheximide. J. Cell. Physiol., 76, 55-63.
- Frankel J. and Heckmann K. 1968: A simplified Chatton-Lwoff impregnation procedure for use in experimental studies with ciliates. Trans. Amer. Microsc., Soc., 87, 317-321.
- Jawetz E. 1970: Polimyxins, colistin, bacitracin, ristocetin and vanomycin. In: Antimicrobial Therapy. (ed. Kagan B. M., Saunders W. B.) Co., Philadelphia, London, Toronto, 91.
- Kuryłowicz W. 1979: Antybiotyki. Aktualny Stan Wiedzy. P.Z.W.L. 224 pp.
- Németh G. and Csik L. 1961: Effect of penicillin on *Tetrahymena pyriformis*, strain GL. I. Multiplication and change of form. Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 11, 405-410.
- Rebandel H., Gierczak A. and Karpińska A. 1981: Toxic action of colistin and penicillins of *Tetrahymena*. I. Lethal effect and an influence on multiplication. Acta Protozool.
- Rogers H. J. 1971: The killing of bacteria by cell wall inhibitors. Symposium on Staphylococcal Infections. September, 1971. Warsaw. (ed. Jeliaszewicz J., Karger S.) Basel, Munchen, Paris, London, New York, Sydney 1973, 117.
- Sebek O. K. 1967: Polymyxins and circulin. In: Antibiotics. I. Mechanism of Action. (ed. Gottlieb D., Shaw P. D.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 142.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. 1969: Biometry. (ed. W. H. Freeman and Co.,) San Francisco, 776 pp.
- Taylor W. D., Gates M. A. and Berger J. 1976: Morphological changes during the growth cycle of axenic and monoxenic *Tetrahymena pyriformis*. Can. J. Zool., 54, 2011-2018.



T. K. KUNDU and D. P. HALDAR

Observations on Two New Species of Cephaline Gregarines  
(Protozoa: Sporozoa) of the Genus *Hirmocystis* Labbé  
from Insects

Received on 13 June 1980, revised on 24 January 1981

*Synopsis.* This paper deals with the morphology and life history of two new species of cephaline gregarines (Protozoa: Sporozoa) belonging to the genus *Hirmocystis* Labbé, 1899, from Orthopteran and Coleopteran insects of Ranaghat, West Bengal, India. These are: (1) *H. theodoridesi* sp. nov. from *Grylotalpa africana* and (2) *H. hoplasomae* sp. nov. from *Hoplasoma unicolor* (Illiger). Informations regarding the seasonal intensity and percentage of infection are also included in the paper.

Labbé (1899) established the genus *Hirmocystis* (Family *Didymophyidae* Léger, 1892). The genus is characterized by (cited from Setna and Bhatia 1934, Haldar and Chakraborty 1979): (1) Sporadins in association of two to 12 or more, in linear series; (2) Epimerite a small, conical or cylindrical knob, caducous; (3) Cysts spherical, dehiscence by simple rupture; and (4) Spores ovoidal with two coats. *H. ventricosa* was described as the type species of the genus, obtained from the intestine of *Tipula oleracea* and *Pachyrhina pratensis* larvae. Since then, workers like Crawley (1903), Hall (1907), Watson (1915), Henry (1933), Setna and Bhatia (1934), Tuzet and Théodoridès (1951), Uttangi and Desai (1961, 1962) and Haldar and Chakraborty (1979) described altogether 18 species from various insect hosts. Recently Levine (1976, published in 1980) transferred two species of *Gregarina* into this genus. In our studies on the cephaline gregarines from insects we have come across some parasites with sporadins in associations of from two to four, arranged linearly, simple papilla-like epimerite, cyst dehiscing by simple rupture liberating ovoidal spores in chains. These are, therefore, identified as belonging

to the genus *Hirmocystis* Labbé, 1899. Since these parasites do not resemble any known species of *Hirmocystis* recorded so far, these are described here as new species.

### Material and Methods

The host insects were collected from various localities in Ranaghat, West Bengal and brought alive to the laboratory for investigation. The insects were decapitated and their guts were carefully dissected out under a dissecting binocular. The parasites were revealed as small white bodies. The infected guts were gently pressed for the parasites to come out from within the gut lumen. Thin smear preparations were made on glass slides and fixed in Schaudinn's fluid and Bouin's fixative. These were subsequently stained with Heidenhain's haematoxylin following mordanting with 3% iron alum solution for overnight. Differentiation was done with 1% iron alum solution under the low power objective of the microscope. Small pieces of infected host guts were fixed in Bouin's fluid and 5.0  $\mu\text{m}$  thick sections were stained as above for studying the nuclear details. Cysts were collected from the hind gut or faecal pellets of the infected hosts and cultured in moist chambers for sporulation. The ratios used in this paper are those of length of protomerite to total length (LP:TL) and the width of protomerite to width of deutomerite (WP:WD). The following abbreviations are used in this paper:

LE — length of epimerite; LP — length of protomerite; LD — length of deutomerite; TL — total length; WE — width of epimerite; WP — width of protomerite; WD — width of deutomerite; LN — length of the nucleus; WN — width of the nucleus.

### Observations

#### *Hirmocystis theodoridesi* sp. n.

The orthopteran, *Gryllotalpa africana* is infected with a gregarine belonging to the genus *Hirmocystis* Labbé which is described here as a new species as it does not resemble any known species of the genus. It is named *Hirmocystis theodoridesi*.

#### Development

The mode of development is extracellular. The earliest stage encountered in the smear preparations is a rounded body measuring 9.9  $\mu\text{m}$  (Fig. 1 1). The nucleus is almost spherical with a large centrally located endosome and a minute endosome located eccentrically. The nucleus measures 4.9  $\mu\text{m}$ . Later, the body is partitioned by a septum into a dome-shaped protomerite, 4.4  $\times$  7.7  $\mu\text{m}$  and a obese deutomerite, 9.9  $\times$  8.8  $\mu\text{m}$  with rounded posterior end (Fig. 1 2). The nucleus at this stage is spherical having the same structural feature as that of the first extracellular stage.



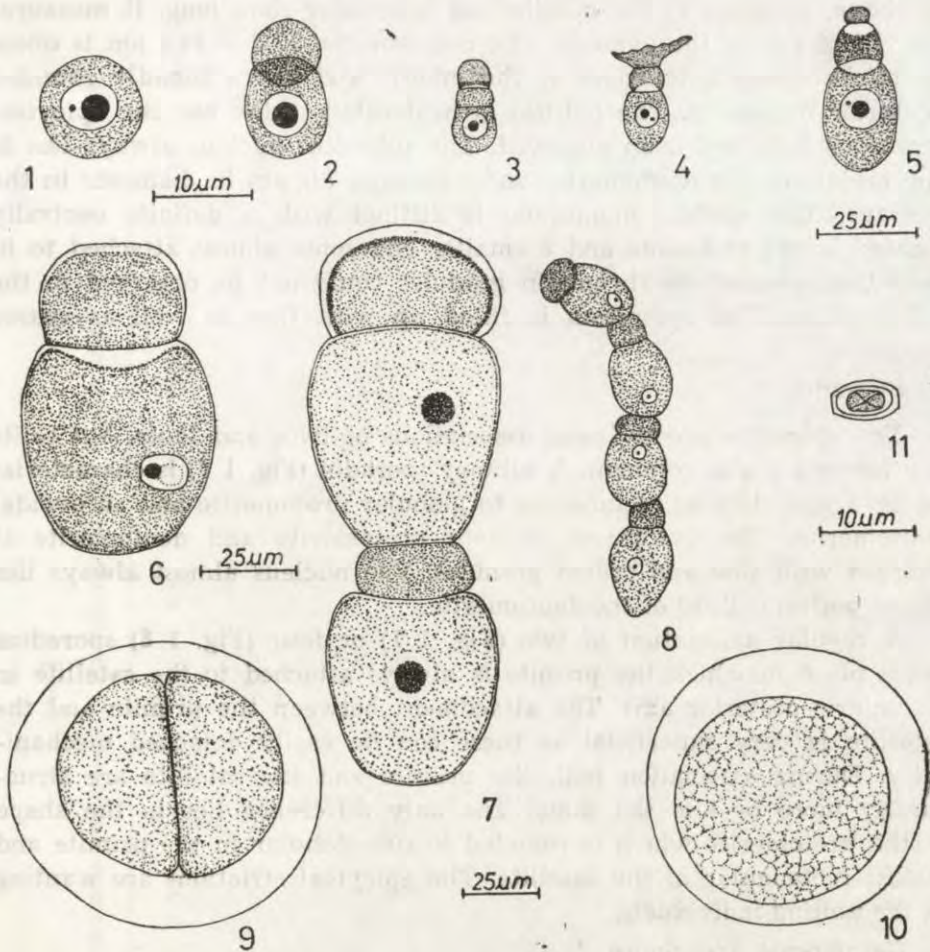


Fig. 1. 1-11. Camera lucida drawings of *Hirmocystis theodoridesi* sp. n. 1 — Early developmental stage from a smear, 2 — Late developmental stage from a smear, 3 — A young trophozoite, 4 — A trophozoite with wavy and hyaline epimerite, 5 — A mature trophozoite with knob-like epimerite, 6 — A sporadin, 7 — Two sporadins in association, 8 — Four sporadins in association, 9 — A freshly formed gametocyst, 10 — Gametocyst after 10 h development, 11 — A mature spore

### Trophozoite

The trophozoite lives freely within the lumen of the mid gut; very young trophozoites are obese in shape but later these become elongated and cylindrical. Initially the epimerite is a dome-shaped body (Fig. 1 3), changes to a fringed structure with wavy hyaline margin (Fig. 1 4) and finally transforms to a transparent knob-like structure (Fig. 1 5). It measures  $7.0 \times 8.7 \mu\text{m}$  in the average. The protomerite is hemispherical



in shape, broadest at the middle and is broader than long. It measures  $7.2 \times 11.4 \mu\text{m}$  in the average. The deutomerite,  $17.3 \times 14.6 \mu\text{m}$  is obese or pitcher-shaped, broadest at the middle and has a broadly rounded posterior extremity. The pellicle is moderately thick but the epicyteal striations have not been observed. The spherical nucleus always lies in the middle of the deutomerite and measures  $7.0 \mu\text{m}$  in diameter in the average. The nuclear membrane is distinct with a definite centrally located larger endosome and a smaller endosome almost attached to it. Any Feulgen-positive chromatin granules could not be observed in the nucleoplasm. The cytoplasm is filled up with fine as well as coarse granules.

#### Sporadin

The sporadins are in linear associations of twos and fours, but solitary forms are also common. A solitary sporadin (Fig. 1 6) is characterized by a well defined rectangular to globular protomerite and an ovoidal deutomerite. The cytoplasm in both protomerite and deutomerite is charged with fine and coarse granules. The nucleus almost always lies at the posterior third of the deutomerite.

A regular association of two (Fig. 1 7) or four (Fig. 1 8) sporadins takes place in which the primite is always attached to the satellite in an antero-posterior axis. The attachment between the primite and the satellite is very superficial as these can be easily detached mechanically. During association both the primite and the satellite are structurally more or less the same. The only difference lies in the shape of the protomerite which is rounded to sub-globular in the primite and almost rectangular in the satellite. The epicyteal striations are wanting in the uniting individuals.

#### Gametocyst and Spore

A freshly formed gametocyst (Fig. 1 9) is opaque white in colour, densely granulated and almost spherical in outline. The enclosed gametocytes are of equal size, but sometimes they may also be unequal in size. The gametocysts measure  $52.6 \times 49.8$ – $70.1 \times 63.7 \mu\text{m}$ . There is a gelatinous transparent ectocyst varying in thickness from  $19.3$ – $29.4 \mu\text{m}$ . At about 10 h of development inside the moist chamber the constriction between the gametocytes disappears (Fig. 1 10). At 30 h of development, the cyst bursts by a simple rupture liberating spores in chains. The spores (Fig. 1 11) are dolioform or barrel-shaped, double-walled and measure  $6.6 \times 4.4 \mu\text{m}$  in the average. Formation of sporozoites is completed within 66 h of development inside the moist chamber. The sporozoites are arranged in a characteristic manner within the spore: four lie at the centre and four at the periphery.



Table 1

Showing the details of measurements (in  $\mu\text{m}$ ) of the different parts of *H. theodoridesi* sp. n.

Specimen No.	LE	LP	LD	TL	LP : TL	WE	WP	WD	WP : WD	Nucleus
1	5.54	5.54	8.31	19.39	1 : 3.5	8.31	8.31	9.69	1 : 1.16	4.15
2	5.54	4.15	11.08	20.77	1 : 5.0	8.31	8.31	11.08	1 : 1.33	5.54
3	8.31	5.54	11.08	24.93	1 : 4.5	9.69	11.08	12.46	1 : 1.12	5.54
4	4.15	5.54	13.85	23.54	1 : 4.2	6.92	9.69	11.08	1 : 1.14	6.92
5	4.15	8.31	26.32	38.78	1 : 4.66	5.54	11.08	18.0	1 : 1.62	11.08
6	13.85	8.31	19.39	41.55	1 : 5.0	13.85	13.85	16.62	1 : 1.2	8.31
7	6.92	9.7	22.16	38.78	1 : 4.0	9.0	13.85	18.0	1 : 1.2	6.92
8	6.92	9.7	24.93	41.55	1 : 4.28	8.31	13.85	19.39	1 : 1.4	8.31
9	8.31	5.54	11.08	24.93	1 : 4.5	9.69	11.08	11.08	1 : 1.0	5.54
10	6.92	9.7	24.93	41.55	1 : 4.28	8.31	13.85	19.39	1 : 1.4	8.31
11	—	27.7	44.32	72.02	1 : 2.6	—	52.63	55.4	1 : 1.05	11.08
12	—	24.93	58.17	83.1	1 : 3.33	—	48.47	55.4	1 : 1.14	11.08
13	—	22.16	60.94	83.1	1 : 3.75	—	49.86	55.4	1 : 1.11	13.85
14	—	19.39	36.01	55.4	1 : 2.85	—	33.24	33.24	1 : 1.0	9.69
15	—	19.39	41.55	60.94	1 : 3.14	—	33.24	33.24	1 : 1.0	11.08
16	—	19.39	38.78	58.17	1 : 3.0	—	27.7	33.24	1 : 1.2	9.69
17	—	27.7	69.25	96.95	1 : 3.5	—	44.32	58.17	1 : 1.31	13.85
18	—	13.85	27.7	41.55	1 : 3.0	—	27.7	27.7	1 : 1.0	8.31
19	—	19.39	69.25	88.64	1 : 4.57	—	44.32	60.94	1 : 1.37	11.08
20	—	8.31	24.93	33.24	1 : 4.0	—	16.62	19.39	1 : 1.16	6.92
21	—	6.92	18.01	24.93	1 : 3.6	—	11.08	13.85	1 : 1.25	5.54
22	—	30.47	74.79	105.26	1 : 3.45	—	60.94	65.09	1 : 1.06	11.08
23	—	24.93	49.86	74.79	1 : 3.0	—	52.63	55.4	1 : 1.05	11.08
24	—	19.39	69.25	88.64	1 : 4.57	—	44.32	60.94	1 : 1.37	11.08
25	—	23.54	45.71	69.25	1 : 2.94	—	41.55	41.55	1 : 1.0	9.69

### Measurements (in $\mu\text{m}$ )

Figures within parenthesis indicate the average of 25 specimens.

LE — 4.1 to 13.8 (7.0); LP — 4.1 to 30.4 (15.1); LD — 8.3 to 74.7 (36.0); TL — 19.3 to 105.2 (54.0); WE — 5.5 to 13.8 (8.7); WP — 8.3 to 60.9 (28.1); WD — 9.6 to 65.0 (32.6); Nucleus — 4.1 to 13.8 (9.0). LP:TL = 1 : 2.6 to 1 : 5.0 (1 : 3.5); WP:WD = 1 : 1.0 to 1 : 1.6 (1 : 1.1).

The details of measurements of the individual specimens are given in Table 1.

### Material

Holotype, trophozoite on slide No. AH/1, prepared from contents of the midgut of the orthopteran insect, *Gryllotalpa africana*, collected at Ranaghat, West Bengal, India on 24 May, 1978 by T. K. Kundu. Paratypes, many, other particulars are the same as for the holotype material.

### Seasonal Intensity and Site of Infestation

On an average, 14.2% of *Gryllotalpa africana* are usually infected with this gregarine from May to November. During other months of the year the infection is not found. The seat of infection is the mid gut. The cysts are collected from the hind gut.

### Affinities

The gregarine under report belongs to the family *Didymophyidae* Léger, 1892 and genus *Hirmocystis* Labbé, 1899 because it has the following specialized features: sporadins in associations of two or four, in linear series, epimerite a small, cylindrical knob, cysts spherical, dehiscence by simple rupture, spores in chains with two coats. It superficially resembles *H. gryllotalpae* (Léger) Labbé, 1899 in the respect that the two parasites have been described from the same host genus *Gryllotalpa*. But the two species distinctly differ in measurements of total length, gametocyst and spore, structure of the protomerite and shape of the spore. Furthermore, in *H. gryllotalpae* the sporadins are in association of twos and threes, while in the present case they are in associations of twos or fours. *H. gryllotalpae* has been reported from *Gryllotalpa gryllotalpa* in France while the present species has been obtained in *Gryllotalpa africana* in India, the two localities being widely apart from one another. The differences, therefore, justify the creation of a new species for it and the name *Hirmocystis theodoridesi* sp. n. is



Table 2

Showing comparative character of the five species of *Hirmocystis* described from this locality and *H. gryllotalpae* (Léger) Labbé, 1899 from France

Characters	<i>H. bengalensis</i>	<i>H. pitcharis</i>	<i>H. pseudoductis</i>	<i>H. theodoridesi</i> sp. n.	<i>H. hoplasomae</i> sp. n.	<i>H. gryllotalpae</i>
Total length	35.0-222.5 $\mu$ m	62.5-480.0 $\mu$ m	65.0-460.0 $\mu$ m	19.3-105.2 $\mu$ m	93.5-293.2 $\mu$ m	80-90 $\mu$ m
Epimerite	Hyaline papilla; 7.5-10.0 $\mu$ m	Broadly papillated; 6.2 $\mu$ m	Subconical and papilla like 10.0-12.5 $\mu$ m	Dome-shaped, knob-like or with fringed margin; 4.1-13.8 $\mu$ m	Knobed or papilla like; 10.6-10.7 $\mu$ m	—
Protomerite	Hemispherical in trophozoite; sub-spherical in sporadins	Pitcher-shaped in trophozoite; hemispherical in sporadins	Subconical papilla like in trophozoite; globular in sporadins	Hemispherical in trophozoite; rectangular to globular in sporadins	Cylindrical in trophozoite; broadly rounded in sporadins	Subspherical
Sporadin	Bi- or tri-associative	Bi-associative	Bi-associative	Associations of twos and fours	Bi-associative	Associations of two or three
Gametocyst	Egg-shaped, 240.0 $\times$ 170.0 to 300.0 $\times$ 190.0 $\mu$ m. Gametocytes of unequal size. Spores liberated at about 48 h	Egg-shaped, 320.0 $\times$ 190.0 $\mu$ m Unequal gametocytes. Spores issued at about 24 h	Egg-shaped, 400.0 $\times$ 250.0 $\mu$ m Unequal gametocytes. Spores liberated at 48 h	Spherical with ectocyst. 52.6 $\times$ 49.8 to 70.1 $\times$ 63.7 $\mu$ m. Equal gametocytes. Spores liberated at 30 h	Ovoidal, 261.8 $\times$ 233.2 to 349.8 $\times$ 283.2 $\mu$ m. Equal gametocytes. Spores released at 36 h	Spherical; 60.0 $\mu$ m in diameter
Spore	Ovoidal, 7.5 $\times$ 5.0 $\mu$ m. Formation of sporozoites after 72 h of development	Oval, 6.0 $\times$ 4.0 $\mu$ m. Eight sporozoites are formed at about 72 h of development	Ovoidal with two knobs; 7.0 $\times$ 6.0 $\mu$ m. Formation of sporozoites at 74 h	Doliform or barrel-shaped; double-walled; 6.6 $\times$ 4.4 $\mu$ m sporozoites seen at 66 h	Barrel-shaped; double-walled with polar thickenings; 8.3 $\times$ 4.9 $\mu$ m. Formation of sporozoites at 76h	Elongate ovoidal; 5 $\times$ 2.1 $\mu$ m
LP : TL	1 : 4.3	1 : 3.5	1 : 4.6	1 : 3.5	1 : 4.7	—
WP : WD	1 : 1.07	1 : 1.3	1 : 1.2	1 : 1.0	1 : 1.3	—
Host	<i>Myllocerus</i> sp.	<i>Xanthoprechilus</i> sp.	<i>Myllocerus</i> sp. 2	<i>Gryllotalpa africana</i>	<i>Hoplasoma unicolor</i>	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>
Locality	India	India	India	India	India	France
Reference	Haldar and Chakraborty (1979)	Haldar and Chakraborty (1979)	Haldar and Chakraborty (1979)	Present study	Present study	Watson (1916)

proposed after eminent Protozoologist Dr. J. Théodoridès, who has made significant contribution on the cephaline gregarines.

The differences between *H. gryllotalpae* and *H. theodoridesi* sp. n. have been summarized in Table 2.

#### *Hirmocystis hoplasomae* sp. n.

The coleopteran, *Hoplasoma unicolor* Illiger is infected with a gregarine belonging to the genus *Hirmocystis* Labbé which is described here as a new species as it does not resemble any known species of the genus. It is named *Hirmocystis hoplasomae*.

#### Development

The initial development of the gregarine is intracellular. The first or earliest stage of development (Fig. 2 12) seen within the epithelial cells of the host mid gut is a slightly ovoidal or spherical body, measuring  $14.8 \times 12.7 \mu\text{m}$ . The nucleus is spherical and lies at one corner of the body. As it grows, a transverse septum appears dividing the body into a subspherical protomerite,  $6.3 \times 6.3 \mu\text{m}$ , and an elongated cylindrical deutomerite,  $14.8 \times 8.5 \mu\text{m}$ , containing the elliptical nucleus at its posterior extremity (Fig. 2 13). The nucleus measures  $8.5 \mu\text{m}$ . With the development of the epimerite, the parasite leaves the intra-cellular position and the newly formed young trophozoite begins its life within the lumen of the hosts midgut.

#### Trophozoite

The trophozoite lives freely within the gut lumen, where the pH varies from 6.0 to 7.0. Very young trophozoites are, however, seen attached to the epithelial cells by means of their epimerites. A fully grown trophozoite (Fig. 2 14) has a highly flexible cylindrical body with a knob-like epimerite which measures  $15.9 \times 14.8 \mu\text{m}$  in the average. The protomerite is cylindro-conical whose anterior end is somewhat narrower and the posterior end is broad. The cytoplasmic granules are densely accumulated near the anterior region giving it a characteristic conical appearance. The deutomerite is elongated and gradually tapers to a rounded posterior extremity. This is circular in cross section. The pellicle is moderately thick but quite flexible as part of the body can be easily moved on any direction. However, epicyteal striations have not been distinctly observed. The cytoplasm contains coarse as well as fine granules. The nucleus is spherical to ovoidal, measures  $20.1 \times 16.6 \mu\text{m}$  and has a distinct nuclear membrane. The nucleoplasm contains a large endosome and fine chromatin granules.



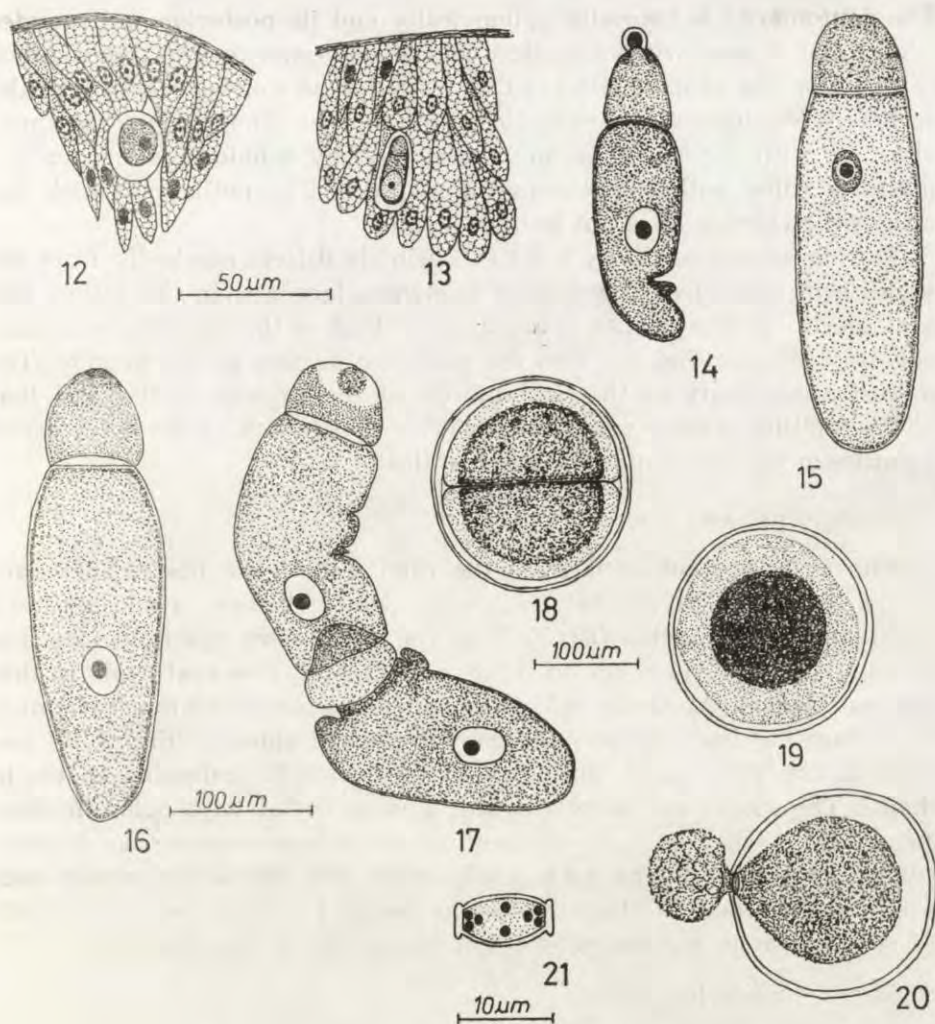


Fig. 2. 12-21. Camera lucida drawings of *Hirmocystis hoplasomae* sp. n. 12 — Early intracellular stage from a section, 13 — Second intracellular stage from a section, 14 — A trophozoite (the flexibility of the pellicle may be noted), 15 — A sporadin, 16 — Another sporadin with different shapes of protomerite and deutomerite, 17 — Sporadins in association (Protomerite of satellite may be noted), 18 — A freshly formed gametocyst, 19 — A gametocyst after 16 h of development, 20 — A cyst dehiscing through a pore, releasing spores in chains, 21 — A mature spore

### Sporadin

These are characteristically biassociative, solitary forms have also been encountered in the smear preparations. The solitary sporadin has an elongated body with the protomerite which is narrow or broadly rounded anteriorly, widest near the protomerite-deutomerite septum.



The deutomerite is typically cylindrically and its posterior end rounded (Fig. 2 15). Forms with elongated conical deutomerite are also common (Fig. 2 16). The protomerite is filled with fine as well as coarse granules while the deutomerite is only finely granulated. The nucleus is almost elliptical with a clear endosome surrounded by a halo, and the nucleoplasm is filled with fine chromatin granules. The pellicle is thick but epicyteal striations have not been observed.

During association (Fig. 2 17) the primate differs markedly from the satellite in structure. The former is always larger than the latter. The protomerite of the primate is blunt while that of the satellite is conical, penetrating some distance into the posterior portion of the primate. The posterior extremity of the deutomerite of the primate is flat and that of the satellite is somewhat rounded. The distribution of the cytoplasmic granules in the two is more or less identical.

#### Gametocyst and Spore

The cysts are collected from the hind gut of the hosts. These are almost spherical to ovoidal yellowish white bodies, enclosing two equal-sized gametocytes (Fig. 2 18). The cysts vary much in size and measure  $261.8 \times 233.2 \mu\text{m}$  to  $349.8 \times 283.2 \mu\text{m}$ . The cyst wall is thin and transparent. At about 16 h of development inside the moist chamber the separating line between the gametocytes disappears (Fig. 2 19) and at 36 h, the cyst bursts through a pore (Fig. 2 20) releasing spores in chains. The spores are barrel-shaped, double-walled with polar thickenings (Fig. 2 21). The polar thickenings are probably made up of some mucoid substance (Sprague 1941) which help the spores attach endwise and thus facilitate their release in chains. Formation of eight rounded sporozoites is completed at 76 h inside the moist chamber.

#### Measurements (in $\mu\text{m}$ )

Figures within parenthesis indicate the average of 20 specimens.

LE — 10.6 to 17.0 (15.9); LP — 21.1 to 63.7 (35.8); LD — 55.2 to 229.5 (129.8); TL — 93.5 to 293.2 (170.4); WE — 12.7 to 19.1 (14.8); WP — 19.1 to 76.5 (35.8); WD — 23.3 to 136.0 (49.7); LN — 12.7 to 36.1 (23.4); WN — 8.5 to 36.1 (18.2). LP:TL = 1:3.6 to 1:6.2 (1:4.7); WP:WD = 1:1.0 to 1:1.7 (1:1.3).

The details of measurements of the individual specimens are given in Table 3.

#### Material

Holotype, trophozoite on slide No. HU/2, prepared from contents of the mid gut of the coleopteran insect, *Hoplasoma unicolor* Illiger, collect-



Table 3

Showing the details of measurements (in  $\mu\text{m}$ ) of the different parts of *H. hoplasomae* sp. n.

Specimen No.	LE	LP	LD	TL	LP : TL	WE	WP	WD	WP : WD	LN	WN
1	17.0	21.25	68.0	106.25	1 : 5.0	14.87	21.25	34.0	1 : 1.6	17.0	17.0
2	17.0	46.75	148.75	212.50	1 : 4.5	19.12	42.50	59.50	1 : 1.4	31.87	21.25
3	17.0	25.50	85.0	127.50	1 : 5.0	14.87	29.75	36.12	1 : 1.2	21.25	17.0
4	17.0	21.25	55.25	93.50	1 : 4.4	12.75	19.12	23.38	1 : 1.2	12.75	12.75
5	17.0	25.50	63.75	106.25	1 : 4.1	14.87	23.38	25.5	1 : 1.0	21.25	17.0
6	10.62	23.38	59.50	93.50	1 : 3.9	12.75	21.25	25.5	1 : 1.2	17.0	14.87
7	—	42.5	114.75	157.25	1 : 3.7	—	25.5	29.75	1 : 1.1	21.25	12.75
8	—	21.25	85.0	106.25	1 : 5.0	—	21.25	29.75	1 : 1.4	17.0	12.75
9	—	29.75	106.25	136.0	1 : 4.5	—	38.25	51.0	1 : 1.3	17.0	17.0
10	—	38.25	199.75	238.0	1 : 6.2	—	42.50	59.50	1 : 1.4	25.50	21.25
11	—	42.50	165.75	208.25	1 : 4.9	—	34.0	46.75	1 : 1.3	25.5	17.0
12	—	38.25	102.0	140.25	1 : 3.6	—	29.75	34.0	1 : 1.1	17.0	12.75
13	—	38.25	182.75	221.0	1 : 5.7	—	38.25	55.25	1 : 1.4	25.5	12.75
14	—	63.75	229.50	293.25	1 : 4.6	—	68.0	93.50	1 : 1.3	34.0	25.5
15	—	51.0	225.25	276.25	1 : 5.4	—	76.5	136.0	1 : 1.7	34.0	21.25
16	—	38.25	127.50	165.75	1 : 4.3	—	51.0	72.25	1 : 1.4	36.12	36.12
17	—	42.50	191.25	233.75	1 : 5.5	—	34.0	51.0	1 : 1.5	29.75	25.5
18	—	51.0	191.25	242.25	1 : 4.7	—	46.75	68.0	1 : 1.4	29.75	29.75
19	—	34.0	119.0	153.0	1 : 4.5	—	27.62	34.0	1 : 1.2	21.25	12.75
20	—	21.25	76.50	97.75	1 : 4.6	—	25.50	29.75	1 : 1.1	14.87	8.50

ed at Ranaghat, West Bengal, India, on 5 October, 1977 by T. K. Kundu. Paratypes, many, other particulars are the same as for the holotype material.

#### Seasonal Intensity and Site of Infestation

The host insects are obtained throughout the year and on an average, 22.0% of them carry infection with this gregarine. The usual seat of infection is the mid gut. The cysts are collected from the hind gut and these are found in abundance during the months of October and November.

#### Affinities

The gregarine is similar to *H. ventricosa* (Léger) Labbé, 1899, the type species of the genus and *H. pitcharis* Haldar and Chakraborty, 1979 in the ratios of LP, TL and WP, WD, but differs from both of them in some characters. From *H. ventricosa* it differs in the size of the cyst and other structural details and from *H. pitcharis*, differs in the structure of epimerite, protomerite, as well as spore measurements. After careful comparison with all species described so far, it is proposed to establish a new species under the genus *Hirmocystis* Labbé for the organism and the name *Hirmocystis hoplasomae* sp. n. is given after the generic name of the host insect.

#### Discussion

In her classifications of the cephaline gregarines, Watson (1916, 1922) placed the genus *Hirmocystis* under the family *Gregarinidae* Labbé, 1899 for the characters like sporadins in association, symmetrical epimerite and insect host. Later Grassé (1953), Chakravarty (1959), Kudo (1971) and Haldar and Chakraborty (1979) discussed on the family placement of the genus. While Grassé (1953) put the genus into the family *Hirmocystidae*, Kudo (1971) retained it under *Gregarinidae* as did Watson. Chakravarty (1959), however, opined that the correct placement, according to the law of priority, should be *Didymophyidae*. His views were supported by Haldar and Chakraborty (1979). We have also similar view regarding the family placement of the genus *Hirmocystis* Labbé.

Informations are inadequate as regards the life history of the various species of *Hirmocystis*. Of the species described so far all the five reported by Uttangi and Desai (1961, 1962) have extracellular development while those described by Haldar and Chakraborty have intracellular development.



In the present study we have observed that *H. theodoridesi* has extracellular development and *H. hoplasomae* has intracellular development.

A comparative chart of characters of the five species of *Hirmocystis* described from this locality is presented in Table 2.

The slides bearing the type materials have been deposited at present to the Department of Zoology, University of Kalyani, and will soon be submitted to the National Collection of Zoological Survey of India, Calcutta.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. A. K. Bose, Head of the Department of Zoology, University of Kalyani, for providing laboratory facilities, to the Director, Zoological Survey of India, Calcutta for identification of the host insects and the Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, for providing a Senior CSIR Fellowship to one of them (TKK).

#### REFERENCES

- Chakravarty M. 1959: Systematic position of some genera and classification of the suborder *Cephalina* Delage and Herouard. Proc. Zool. Soc., 12, 71-81.
- Crawley H. 1903: List of polycystid gregarines of the United States. Proc. Acad. Nat. Sci., Philadelphia, 55, 41-58.
- Grassé P. P. 1953. *Traité de Zoologie*, 1, Masson et Cie, Paris.
- Haldar D. P. and Chakraborty N. 1979: Observations on three new species of Cephaline Gregarines (*Protozoa: Sporozoa*) of the genus *Hirmocystis* Labbé from Coleopteran Insects. Z. Parasitenkd., 59, 121-130.
- Hall M. G. 1907: A study of some gregarines with special reference to *Hirmocystis rigida* n. sp. Stud. Zool. Lab. Univ., Nebraska, 77, 1-26.
- Henry D. P. 1933: *Hirmocystis termitis* (Leidy) and *Kofoidina ovata* gen. nov., sp. nov. from termites. Arch. Protistenkd., 80, 101-115.
- Kamm M. E. 1922: Studies on gregarines. II. Synopsis of the polycystid gregarines of the world, excluding those from the *Myriapoda*, *Orthoptera* and *Coleoptera*. Ill. Biol. Monogr., 7, 1-104, (cited as Watson (1922) in the text).
- Kudo R. R. 1971: Protozoology, 5th edition p. 650. Springfield Illinois, Charles C. Thomas.
- Labbé A. 1899: *Sporozoa*. In: Das Tierreich, Part 5. Berlin: Friedlander.
- Léger L. 1892: Recherches sur les Gregarines. Tabl. Zool. 3, 1-183.
- Levine N. D. 1976: Some nomenclatural corrections among septate gregarines (*Protozoa, Apicomplexa*). Proc. Zool. Soc., Calcutta, 29, 21-28, (published in 1980).
- Setna S. B. and Bhatia B. L. 1934: On some gregarines from a prawn, *Parapeneopsis sculptilis* (Heller). Parasitology, 26, 34-43.
- Sprague V. 1941: Studies on *Gregarina blattarum* with particular reference to the chromosome cycle. Ill. Biol. Monogr., 18, 5-57.
- Tuzet O. and Theodorides J. 1951: Gregarines nouvelles de Coleopteres Tenebrionides. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 26, 394-406.
- Uttangi J. C. and Desai R. N. 1961: On some new gregarines (*Protozoa*) found in the gut of termites from Dharwar, India. J. Karnatak Univ., 6, 71-88.
- Uttangi J. C. and Desai R. N. 1962: On some gregarines from the non-xylophagous termite, *Speculitermes cyclops sinhalensis* from Dharwar (India). J. Anim. Morph. Physiol., 9, 97-109.
- Watson M. E. 1915: Some new gregarines from *Arthropoda*. J. Parasitol., 2, 27-36.
- Watson M. E. 1916: Studies on Gregarines. Ill. Biol. Monogr., 2, 211-468.



## NOTICE TO AUTHORS

ACTA PROTOZOOLOGICA is intended as a journal serving for the publication of original papers embodying the results of experimental or theoretical research in all fields of protozoology with the exception of faunistic notices of the local character and purely clinical reports. The papers should be concise and will not be accepted if they have been previously published elsewhere. After acceptance by the Editors papers will be printed in the possibly shortest time.

Papers are accepted in English, French, German and Russian. Every paper should begin with the name and postal address of the laboratory, name and the surname of the author and title in the language of the text. The titles in German and French should be translated into English according to the demands of Current Contents. The paper should be accompanied by synopsis in the language of the text not exceeding 100 words and by short summary in one of 4 languages accepted in the Journal. In the Russian text also the name and the postal address of the laboratory, legends of tables, plates and text illustrations must be translated, the translation of the summary may be somewhat more extensive, and the name of the author should be given additionally also in the Latin characters.

Manuscripts should be double-spaced typescript (30 lines on one side of a sheet) with a normal margin. No elements of the text should be fully typed in capitals nor in spaced set (only underlining with pencil is admissible). In decimal fractions points not commas should be used. The generally accepted abbreviations and symbols are recommended. Nomenclature must agree with the International Code of Zoological Nomenclature, London 1961. The original and one carbon copy of the whole text material should be supplied.

References must be cited in the text indicating only the author and year thus: "Kinosita (1954) found that, etc."

Only all references cited in the text should be listed. The list must be arranged as follows:

Ehret C. F. and Powers E. L. 1959: The cell surface of *Paramecium*. Int. Rev. Cytol., 8, 97-133.

Gelei J. von 1939: Das äussere Stützgerüstsystem des Parameciumkörpers. Arch. Protistenk., 92, 245-272.

Titles of references are given in their original language (not translated). In papers written in English, French or German, the Cyrillic type of the Russian references is transliterated according to the international system (ISO Recommendation R 9 September). This regulation is not applied to names if there exists in their traditional spelling. Also author may freely choose in transliteration of his own name. In Russian papers, the Russian references are cited in Cyrillic, the others in the Latin characters, but they must be listed all together in the Latin alphabetical order.

The following material should be supplied on separate sheets 1. the running title for the page headlines, 2. tables, 3. legends for text figures, 4. legends for plates. Line-drawings will be published in the text, photographs and raster figures on separate plates. No coloured photographs can be published presently. Lettering on photographs and drawings should be marked in pencil. With no regard to the language of the text, only the Latin lettering, arabic numerals or generally accepted symbols are admissible for marking on illustrations. Numbering of text-figures, plates and tables must be also marked in pencil, as well in the legends as in the text.

Galley proofs are sent to the authors. Authors receive 75 reprints without covers.



### In preparation:

M. Jerka-Dziadosz: Patterning of Ciliary Structure in *Janus* Mutant of *Tetrahymena* with Mirror-image Cortical Duplications. An Ultrastructural Study — M. Wolska: Studies on the Genus *Triadinium* Fior. (*Ciliata*, *Entodiniomorphida*). Comparison of *Triadinium galea* Gass. and *Triadinium caudatum* Fior. — A. Czapik: La morphogenèse chez les cilié *Diophrys oligotrix* Borror — J. J. Nieto, P. Calvo, A. Torres et J. Perez-Silva: Régénération chez *Gastrostyla steinti* — S. L. Kazubski: Further Investigation on Morphological Variability of *Semitrichodina sphaeronuclea* f. *macrodentata* (Lom) (*Ciliata*, *Peritrichida*), a Parasite of Land Snails — N. Ricci: The Ethogram of *Oxytricha bifaria* Stokes (*Ciliata*, *Hypotrichida*). I. The Motile Behaviour — K. P. Janardanan and P. Ramachandran: *Stenoductus chondromorphi* sp. n. (*Sporozoa*: *Cephallina*) from the Polydesmid Millipede, *Chondromorpha keleari* (Humbert) — R. Lal and D. M. Saxena: Effect of DDT on Cell Division and DNA, RNA and Protein Synthesis in a Ciliate Protozoan, *Blepharisma intermedium*

### Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej: rocznie zł 200,— półrocznie zł 100,—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do 25 listopada na I półroczu roku następnego i na cały rok następny,
- do 10 czerwca na II półroczu roku bieżącego.

Jednostki gospodarki społecznej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

## CONTENTS

C. Miceli, P. Luporini and P. Bracchi: Morphological Description Breeding System, and Nuclear Changes during Conjugation of <i>Euplotes raikovi</i> Agamaliev from Mediterranean Sea . . . . .	215
G. Rosati, F. Verni, R. Nobili and M. Angeli: Starvation in <i>Euplotes crassus</i> (Ciliata, Hypotrichida): Ultrastructure Modifications and Effects on Reproduction . . . . .	225
A. И. Раилкин: Выбор пищи инфузориями-сидиментаторами (фильтраторами) <i>Paramecium caudatum</i> Ehrbg. и <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg. . . . .	233
[A. I. Railkin: Choice of Food by the Ciliates <i>Paramecium caudatum</i> Ehrbg. and <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg.] . . . . .	233
A. И. Раилкин: Количественный анализ фагоцитоза <i>Paramecium caudatum</i> Ehrbg. и <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg. . . . .	255
[A. I. Railkin: The Quantitative Analysis of Phagocytosis in <i>Paramecium caudatum</i> Ehrbg. and <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg.] . . . . .	255
M. Brutkowska and E. E. Orlovskaja: The Influence of Detergents on Feeding Behaviour of Carnivorous Protozoon, <i>Dileptus anser</i> . . . . .	281
H. Rebandel and A. Karpińska: Toxic Action of Colistin and Penicillin V and G on <i>Tetrahymena</i> . II. Inhibition of Phagocytic Activity . . . . .	291
H. Rebandel: Toxic Action of Colistin and Penicillin V and G on <i>Tetrahymena</i> . III. Effects on Pairing for Conjugation . . . . .	299
L. Szablewski: The Effect of Selected Antibiotics on <i>Tetrahymena pyriformis</i> . . . . .	309
T. K. Kundu and D. P. Haldar: Observations on Two New Species of Cephaline Gregarines (Protozoa: Sporozoa) of the Genus <i>Hirmocystis</i> Labbé from Insects . . . . .	323

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Wrocławska Drukarnia Naukowa

Index 35133