

directions may not always be the immediate factor of separation.

Significance of apparent and temporary fusion of the 2 sister amoebae of *E. invadens* found in the present investigation and in *E. histolytica* by others^{3,27} remains far from clear³¹.

It should be stressed that all the observations noted above and recorded are from the in vitro cultures of *Entamoeba*. It remains to be ascertained whether they behave similarly in vivo³².

Zusammenfassung. Bei *Entamoeba invadens* wurde eine ungleiche zellplasmatische Teilung beobachtet. Ein ent-

sprechender Teilungsmodus gilt auch für *E. ranarum* und *E. moshkovskii*.

TARA N. GHOSH

Department of Protozoology,
Calcutta School of Tropical Medicine,
Calcutta 12 (India), 9 December 1968.

³¹ A. BISHOP, Parasitology 24, 225 (1932).

³² Acknowledgment. I am grateful to Prof. J. F. DANIELLI for providing the facilities and for his interest and encouragement. It is my pleasure to thank Dr. R. A. NEAL for the gift of initial cultures of amoebae and for his advice and help. Financial assistance of the Calcutta University and the Wellcome Foundation, London, is gratefully acknowledged.

Weitere Untersuchungen über den Parasitismus von Labyrinthula gegenüber Pilzen¹

Morphologie und Lebensweise der Labyrinthula sind so ungewöhnlich, dass diese Organismen keiner der bestehenden Klassen des Tier- oder Pflanzenreichs zugeordnet werden konnten. Eigene Untersuchungen ergaben, dass die labyrinthartig verzweigten Fadenplasmodien der Labyrinthula aus Limax-Amöben entstehen. Kriterien, die von vegetativen Amöben abweichen, haben sich im Zusammenhang mit der Zystendifferenzierung dieser Amöben herausgebildet². Die vegetativen Limax-Amöben leben stets einzeln. Erst nach der Differenzierung einer doppelten Hülle fusionieren die äusseren Plasma-bezirke benachbarter Zellen. Dagegen grenzt sich das kernhaltige Zentralplasma jeder einzelnen Amöbe durch die Differenzierung der inneren Hülle ab und bleibt selbständig. STEY³ wies ein Verbindungsorganell zwischen Zentralplasma und äusserer Hüllschicht nach.

Der Prozess der Zystendifferenzierung bedingt funktionelle Abwandlungen. Im Gegensatz zu den solitären Amöben, aus denen die Verbände der Labyrinthula entstehen, nehmen sie keine geformte Nahrung auf und bewegen sich nicht amöboid. Ein sehr wesentliches Phänomen ist die parasitische Angriffskraft, die ihren solitären Amöben fehlt. Unlängst stellten wir fest, dass die Labyrinthula in zahlreiche parasitische Pilze eindringen und deren Protoplasten zerstören können⁴. Wir untersuchten daher auch Vertreter dieser Organismengruppe aus anderen Gebieten.

Material und Methode. Im Oktober 1968 wurde Pflanzenmaterial (*Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa cupressoides*, *Penicillus* sp., *Dictyota dichotoma*, *Syringodium* sp., *Thalassia* sp., *Cladophora* sp., *Acetabularia* sp.) in der atlantischen Litoralzone nahe Havanna (Arroyo Bermejo, Refcon de Guanabo, Instituto de Oceanologia Habana, Playa de Baracoa) gesammelt (Wassertemperatur 27,5–29°C). Die Methoden der Isolierung, Anreicherung und Kultivierung von Labyrinthula aus Pflanzen wurden bereits beschrieben⁵. Als Agarboden wurde Meerwasseragar (Salzgehalt 3,5% und 1%) verwandt. Bevor die Labyrinthula auf nährstoffreiche Agarböden übertragen werden, müssen sie frei von lebenden Bakterien sein. Dies wird durch Wanderung über flächig ausgebreitete, hitzegetötete Bakterien auf nährstoffarmen Meerwasser-Agarplatten erreicht.

Die parasitische Angriffskraft der Labyrinthula wurde gegenüber *Curvularia* sp., *Fusarium vasinfectum*, *Fusarium oxysporum* var. *cubensis*, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pestalozzia*

sp. und den Hauptpilzen *Madurella grisea*, *Histoplasma capsulatum* und *Trichophyton gallinae* untersucht. Die Hauptpilze wurden bereits 5 Tage vor den Labyrinthula auf die Kulturplatten übertragen.

Ergebnisse. Labyrinthula konnte nur von Cladophora-Algen aus Arroyo Bermejo, Playa de Baracoa und der Nähe des Ozeanologischen Instituts Havanna isoliert werden. Die Fadenplasmodien entwickelten sich auf Meerwasser-Agarplatten mit einem Salzgehalt von 3,5%. Aber auch Agarböden mit verdünntem Meerwasser (Salzgehalt 1%) waren gleichermassen geeignet. Für die Versuche mit Pilzen diente Meerwasseragar mit 1% Salzgehalt (pH 5,7), auf dessen Oberfläche hitzegetötete Bakterien flächig ausgespatelt waren. Das Pilzwachstum nahm seinen Ausgang von einem Nährboden (Biomalz- oder Sabouraud-Agar), der in ein kleines Fenster (etwa 1×2 cm) nahe der Plattenperipherie gegossen wurde. Die Labyrinthula begannen ihre Wanderung im gegenüberliegenden Bereich der Platte. Sie sammelten sich an den Hyphen der Pilze und drangen in den meisten Fällen in sie ein. In den Hyphen zeigten sie starkes Wachstum und befielen schnell alle Verzweigungen des Myzels. Mit Hilfe ihrer Enzyme zerstörten sie die Protoplasten in den Hyphen, aber nicht die Zellwände. Die Myzelien solcher Kulturen erscheinen transparent und können leicht von den dicht bewachsenen Kontrollplatten unterschieden werden.

Die in Kuba isolierten Labyrinthula zeigen grösste parasitische Aktivität gegenüber *Fusarium oxysporum* var. *cubensis*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium vasinfectum*, *Pestalozzia* sp. und *Colletotrichum gloeosporioides*. Intensiv geschädigt werden auch *Rhizoctonia solani* und der Hauptpilz *Trichophyton gallinae*. Nur *Curvularia* sp., *Madurella grisea* und *Histoplasma capsulatum* werden von diesen Labyrinthula-Stämmen nicht zerstört.

Diskussion. Die erstmalig in Kuba beobachteten und kultivierten Labyrinthula entfalten gegenüber wichtigen

¹ Diese Arbeit wurde am Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Habana (Kuba) durchgeführt und in dankenswerter Weise unterstützt.

² H. SCHMOLLER, Naturwissenschaften 53, 711 (1966).

³ H. STEY, Z. Naturforsch. 23b, 567 (1968).

⁴ H. SCHMOLLER und B. WIEGERSHAUSEN, Naturwissenschaften 55, 657 (1968).

⁵ H. SCHMOLLER, Arch. Protistenk. 109, 226 (1966).

schädlichen Pilzen dieses Gebiets eine grosse parasitische Aktivität. Beachtenswert ist ihre Angriffskraft gegenüber dem Hautpilz *Trichophyton gallinae*. Die Labyrinthulen zeigten auch bei *Rhizoctonia solani* einen deutlichen Effekt. Das Wachstum eines anderen Stammes dieses Pilzes wurde von Labyrinthulen aus der Ostsee kaum beeinflusst⁴. Die Hyphen von *Histoplasma capsulatum* waren in der Kultur so schmal, dass die Labyrinthulen nicht in sie eindringen konnten. Dieser negative Befund besagt jedoch nicht, dass Labyrinthula nicht doch Histoplasma in Felsenhöhlen vernichten kann, da der Pilz dort eine andere und für die Labyrinthulen vielleicht geeignetere Wachstumsform zeigt.

Summary. Labyrinthula could be isolated from marine *Cladophora* algae in Cuba. These strains were very active against several fungi, causing diseases of plants or skin, like *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. vasinfectum*, *Pestalotzia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Trichophyton gallinae* and destroyed the protoplasm of the hyphae by means of their parasitic activity.

H. SCHMOLLER und B. WIEGERSHAUSEN

*Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Rostock (DDR), 30. Januar 1969.*

Is Fresh-Water *Hydra vulgaris attenuata* a Spirochaetales' Reservoir Host?

In the process of research on gametogenesis of *Hydra vulgaris attenuata*, by electron microscope, we found some spirochaetales, sometimes very numerous, in the mesoglea of many animals (Figures 1 and 2). The hydras, hosts of spirochaetes, were not in a suffering condition; in fact cultures were not depressed, although the infestation must have lasted a long time because the hydra specimens selected for examination were drawn from time to time for a period of several months.

The hydras were reared at 18–20 °C in a 5 l aquarium where aquatic plants (*Elodea* and *Myriophyllum*) were present, and fed every other day with *Daphnia*. Hydras, in different gametogenic stages, were fixed in 1% OsO₄ in veronal acetate buffer at pH 7.4. They were rapidly washed, dehydrated, infiltrated with uranylacetate and embedded in Epon 812 or in Araldite. The sections, obtained with a LKB ultramicrotome, were stained with lead salts according to MILLONIG's method¹ and observed with a Siemens Elmiskop 1 electron microscope².

The spirochaetales were always found in mesoglea of hydra, while, on the other hand, in epi- and gastrodermis no spirochaetes were present. This suggested that the presence of spirochaetales in hydra's mesoglea was not a fortuitous fact, because in the case of merely strong spirochaetal pollution of environment water and their occasional ingestion by hydras, gastrodermal cells should have shown spirochaetes in their food vacuoles.

Electron micrographs of sections of these spirochaetales revealed some morphological features (Figure 2). Their small spirals are 0.2 µ in length. Periplast membrane is present. The protoplast is spirally wound around a well-defined axial filament (Figure 3).

Morphological aspects do not allow us to determine with certainty either the genus or the species; nevertheless we are inclined to consider these spirochaetales as a *Leptospira*. In order to recognize the serotype, it would be essential to culture the spirochaetale³, but that has not been possible as yet, because only 'a posteriori' we found the pollution of hydra rearings and our present clones are no longer infested.

Mesoglea seems to be a good natural culture medium for spirochaetales. The mesolamella of hydra is an acellular layer between epi- and gastrodermis, consisting of an electron-lucent ground substance, within which tiny filaments of about 100 Å in diameter are randomly dispersed. In addition there are many granules identified as glycogen particles (SLAUTTERBACK and FAWCETT⁴) (Figure 2). The scattered fibrils have been considered

collagenous-like by some authors (CHAPMAN⁵), elastic-like or mixed by others (BOUILLON and VANDERMEERSCH⁶ BOUILLON⁷).

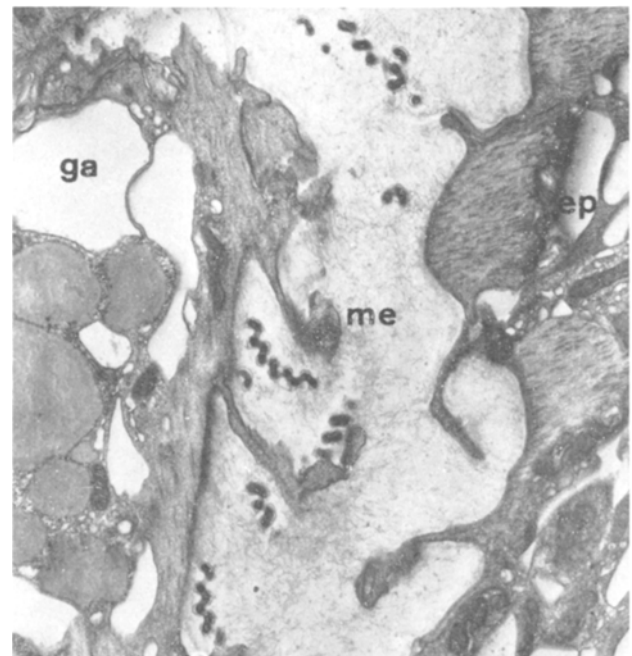


Fig. 1. Electron micrograph of a mesogleal tract crossed by cytoplasmic processes of epi- and gastrodermal cells. Many spirochaetales are present. Fibrils scattered. ga, gastrodermis; me, mesoglea; ep, epidermis. × 12,000.

¹ G. MILLONIG, J. Biophys. biochem. Cytol. 11, 736 (1961).

² Preparation were carried out in the Centro di Microscopia elettronica of Bologna University.

³ On this problem we wish to express our thanks to Prof. BABUDIERI of the Istituto Superiore di Sanità di Roma for his suggestion.

⁴ D. B. SLAUTTERBACK and D. W. FAWCETT, J. Biophys. biochem. Cytol. 5, 441 (1959).

⁵ G. CHAPMAN, Q. Jl microsc. Sci. 94, 155 (1953).

⁶ J. BOUILLON and G. VANDERMEERSCH, Annls Soc. r. zool. Belg. 87, 9 (1956).

⁷ J. BOUILLON, Bull. biol. Fr. Belg. 93, 5 (1959).