

VERDAUUNGSPHAGOCYTOSE BEI DEN AUSTERN.

Von

H. J. VONK JR.

(Aus dem Vergleichend-Physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. März 1924.)

Bevor wir die Besprechung der ausgeführten Experimente anfangen, wollen wir zuerst kurz überschauen inwieweit die Fragen, die man beim Studium der Ernährung von *Ostrea* zur Lösung bringen möchte, in der vorliegenden Literatur ihre Beantwortung gefunden haben.

Es war schon lange bekannt, und wird u. a. von MÖBIUS (1877), von HUXLEY (1883) und VILLIANES (1892) erwähnt, daß die Austern imstande sind, mikroskopische Organismen und anorganische Teilchen den Kiemen entlang dem Munde zuzuführen. Nicht alles aber, was auf diesem Wege zum Munde gelangt, wird aufgenommen; ein Teil der Körperchen wird durch eine Rückströmung und später durch Zuklappen der Schalenhälften wieder nach außen befördert. Durch die Untersuchung des Mageninhaltes haben einige Autoren uns ein Bild gegeben von den Stoffen, welche auf diese Weise in den Darmkanal gelangen. MÖBIUS (1) findet die verschiedenartigsten pflanzlichen wie tierischen Microorganismen. LOTSY (2) beobachtet im Mageninhalt amerikanischer Austern (*Ostrea virginiana* LIST) vorwiegend Diatomeen, und zwar pelagische, während REDEKE (3) bei Austern von Zeeland hauptsächlich benthonische Diatomeen findet¹⁾. REDEKE berichtet, und auch LOTSY hatte dies schon betont, daß zwar mancherlei andere Organismen sich im Mageninhalt vorfinden, bei fortgesetzter Untersuchung aber nur die Diatomeen regelmäßig darin angetroffen werden. Aus diesem regelmäßigen Vorkommen schließen sie auf die Bedeutung dieser Organismen als Hauptbestandteil der Austernahrung. In einer Dissertation hat HEYMAN (4) die Angaben REDEKES über den Mageninhalt bestätigt; er bemerkt nur hierzu, daß dieser einen größeren Gehalt an Detritus aufweist als von REDEKE wahrgenommen war.

Über den Mechanismus der Nahrungsaufnahme sind wir hauptsächlich durch die Untersuchungen STENTAS unterrichtet (5), obwohl *Ostrea* nicht eine der Formen ist, die am eingehendsten von ihm unter-

¹⁾ In diesem Berichte auch ältere Literatur (S. 119).

sucht worden sind. Im allgemeinen werden bei den Lamellibranchiaten die im Wasser suspendierten Teilchen mit dem zuführenden Atmungsstrom auf die Kiemen gebracht, welche als Sieb fungieren und die Teilchen auf Schleimfäden zu ihrem Rande und diesem entlang nach vorn fortbewegen. STENTA fand, daß diese Fortbewegung nicht von einem Wasserstrom, wie man früher meinte, sondern direkt vom Wimperschlag verursacht wird. Bezüglich der genauen Richtung dieser Strömungen auf den Kiemenlamellen und der der Rückströmung über die Innenseite des Mantels, welche die vom Munde nicht aufgenommenen Teilchen abführt, lassen sich bei den einzelnen Arten große Unterschiede nachweisen. Für *Ostrea* wird in STENTAS Arbeit erwähnt, daß die Rückströmung in der Mundgegend anfängt, nach hinten zieht bis zu gewissen Erhebungen an der inneren Mantelfläche, wo die Carminkörnchen sich zu Fäden zusammenlegen, die eine mit dem Mantelrand parallele Lage einnehmen und wahrscheinlich durch das Zuklappen der Schale nach außen getrieben werden. Die genaue Funktion der Mundlappen ist für *Ostrea* nicht ermittelt und auch für andere Formen ist in dieser Hinsicht kein positives Resultat erreicht worden.

Der gesamte Darmkanal wird in anatomischen Beschreibungen (BIEDERMANN [29] in WINTERSTEINS Handbuch S. 1026) als mit einem Wimperepithel ausgestattet beschrieben. Ein solches Wimperepithel bekleidet auch die Wände der Kanäle, die vom Magen in die Leber führen¹⁾, aber die Leberblindsäckchen bestehen aus Zellen ohne Cilien. Der Wimperschlag würde also genügen, um die Fortbewegung der Nahrung den ganzen Darm entlang zu ermöglichen. Vielleicht spielen auch Lebercontractionen (bei anderen Formen wahrgenommen) eine Rolle.

Recht wenige Untersuchungen sind über die Art der Enzyme der Lamellibranchiaten ausgeführt worden; gerade für *Ostrea* aber wurde in der schon zitierten Dissertation HEYMANN'S (4) dieser Punkt eingehend erforscht. Für andere Formen beziehen sich die neueren Angaben über Fermente meistens auf die An- oder Abwesenheit im Krystallstiel. HEYMANN hat bei *Ostrea* eine große Anzahl Enzyme gefunden, und zwar im Leberpreßsaft proteolytische mit einem Wirkungsoptimum bei 0,1% HCl und bei 0—2 oder 3% Soda, von ihm „Pepsin“, bzw. „Trypsin“ genannt. Die Wirkung wurde vorwiegend an Gelatineplatten gezeigt; auf Fibrin und koaguliertes Hühneriweiß war ihre Wirkung nur sehr gering. Von den Carbohydrasen wurden gefunden: Pectinase, Amylase, Gelase, Maltase, Lactase, Inulase, Glycogenase, Dextrinase, Invertase — im Krystallstiel nicht mehr Amylase und Invertase als im übrigen Mageninhalt — ferner Lipase, in welchem Organ wird nicht angegeben. Wo diese Enzyme abgeschieden werden, ist nicht bekannt.

¹⁾ Von LIST (6) Magenleberkanäle genannt.

Eine besondere Aufmerksamkeit verdienen beim Studium der Ernährung bei Lamellibranchiaten der Krystallstiel und die Mitteldarmdrüse (sogenannte „Leber“).

COUPIN (7) hat bei *Cardium edule* im Krystallstiel Diastase, Amylase und Invertase gefunden, MITRA (8) gelangt zum gleichen Resultate bei *Maetra*, *Donax*, *Unio*, *Anodonta*, *Pholas* und *Mytilus*. VAN RYNBERK (9) bei *Mytilus edulis* und *M. galloprovincialis*. Eine Protease fehlt, ebenso wahrscheinlich Cytase. Nach diesen Untersuchungen würde man den Krystallstiel als eine Gallerte zum Festhalten der Enzyme auffassen müssen, obwohl die Stelle, wo die Enzyme abgeschieden worden, noch nicht ermittelt ist. Eine ausführliche Übersicht älterer Meinungen über den Stiel findet man bei BIEDERMANN (l. c.) und bei VAN RYNBERK.

Im Jahre 1916 erschien eine ungarische Arbeit von GORKA, deren Resultate mir nur aus dem deutschen Auszug bekannt sind. Der Schleim der Kiemen von *Anodonta* und *Unio* enthält nach GORKA polysaccharide-, glukoside- und fettsplattende Enzyme, keine Proteasen und keine Zellulase; derjenige der Mundlappen auch noch eine Protease. Kürzlich hat C. M. YONGE (26) für *Mya arenaria* gefunden, daß der Krystallstiel keine Protease besitzt, wohl aber Amylase; Hepatopancreasextrakt besitzt Protease und Amylase (der Autor scheint anzunehmen, daß diese im Extrakt gefundenen Enzyme auch nach außen abgeschieden werden; da frühere Autoren im Magensaft eine Protease vermißten, so würde man diese Secretion von Protease gern bewiesen sehen, z. B. durch Nachweis im Magensaft). Im Mitteldarm kommen keine Enzyme vor.

Wir kommen jetzt zur Besprechung der letzten Frage, die wir uns stellen können: Die Bedeutung der sogenannten Leber. Über ihre Funktion, die Vergleichbarkeit mit der Säugetierleber, über den Namen endlich, den das Organ am zweckmäßigsten erhalten könnte, gibt es eine ausgedehnte Literatur, sowohl für die ganze Molluskengruppe, als für die höheren Crustaceen und die Spinnen. Den Namen „Leber“, der auf einer oberflächlichen Analogie beruhte, hat man verlassen müssen, sobald es sich zeigte, daß dieses Organ keinerlei Funktion hatte, die für die Wirbeltierleber spezifisch ist. Ebenso wenig hat man aus denselben Gründen den Namen Hepatopancreas aufrecht erhalten können. In ein ganz anderes Stadium ist die „Leberfrage“ der Wirbellosen gekommen, seit BERTEKAU für Spinnen (1884), ST. HILAIRE (1892), CUÉNOT (1895) und JORDAN (1904) für höhere Crustaceen, BIEDERMANN und MORITZ (1899) für Gastropoden (bei *Helix*), ENRIQUES (1901) für *Aplysia* zeigen konnten, daß die Nahrung in die „Leber“ eindringt und daselbst resorbiert wird. LIST (6) fütterte (1901) Tuschke an *Mytilus galloprovincialis* und nahm in seinen Präparaten wahr, daß die Körnchen nicht nur in die Magenleberkanäle und Blindsäckchen geraten waren.

sondern auch von den Leberzellen aufgenommen wurden, aus welchem Befund er schloß, daß auch die gewöhnliche Nahrung von den Leberzellen in der Weise phagocytirt wird. Eine derartige Aufnahme von festen Nahrungspartikeln durch Darmzellen ist schon u. a. 1878 von METSCHNIKOFF für Rhabdocoelen gefunden, später von demselben Autor (1880), von KRUKENBERG (1880) und von WILLEM (1894) für Actinien, von JORDAN (1918) für *Helix* in der Leber (mittels Carminfütterung) festgestellt worden. Bei *Helix* dürfte diese Phagocytose die Aufnahme von Eiweißsubstanzen bewirken, da eine Protease fehlt. Eine Übersicht der „Leberfrage“ findet man bei JORDAN: „Die Leberfrage bei den wirbellosen Tieren.“ (Zool. Jahrb. Suppl. XV, Heft 3 [1912]. Hier auch ausführliche Literaturzitate.) Auf Grund der von den genannten Autoren erlangten Resultate kommt JORDAN zu folgendem Schluß: „Die Leber von Krebsen, Muscheln, Schnecken und Spinnen sind gar nichts anderes als Systeme von Blinddärmen.“

HEYMANN hat in seiner schon genannten Dissertation der Meinung LISTS über die Phagocytose widersprochen, ohne Versuche hierüber anzustellen. Auf seine Bestreitung der LISTschen Meinung und auf seine Theorie der Eiweißverdauung bei der Auster kommen wir bei der Besprechung der Resultate unserer Versuche ausführlicher zurück.

Bedenkt man nun noch, daß man außer der oben besprochenen Literatur den Ansichten CARAZZIS (10) und PÜTTERS (14) Rechnung zu tragen hat, die behaupten, daß organische Nahrung in gelöstem Zustande von den Kiemen aufgenommen werden kann und von dort durch Amöbocyten der Leber zugeführt wird, welche sie dann assimiliert, so wird man einsehen, wie wenig man über die Fragen bezüglich der Ernährung von *Ostrea* und von den Lamellibranchiaten im allgemeinen zur Übereinstimmung gekommen ist.

In erster Linie war es unsere Aufgabe zu ermitteln, ob die Resultate, die LIST mit seinen Mytiliden gewonnen hatte, nämlich die Aufnahme von Farbstoffkörnchen in die „Leber“-¹⁾Zellen, auch für *Ostrea* erzielt werden konnten. Die Austern²⁾ wurden dazu in kleine Aquarien gebracht, worin sich eine Suspension von feingepulverter Tusche in Seewasser befand. Ab und zu wurde Luft durchgeblasen, so daß die Tiere bis über eine Woche in diesen Aquarien am Leben erhalten werden konnten. Die Feinheit der Suspension wurde unterm Mikroskop kontrolliert; die kleinsten Teilchen zeigten sich in lebhafter Brownscher Bewegung. Da die Versuche mit Tusche zwischen Mitte Februar und Anfang März ausgeführt wurden, war die Zeit für die Nahrungsaufnahme, wenn die

¹⁾ Der Kürze wegen werden wir diese unrichtige Benennung hier beibehalten.

²⁾ Die Austern kamen von Zeeländischen Austernbänken (Yerseke) her.

betreffenden Angaben der Literatur allgemeine Gültigkeit haben, nicht mehr sehr günstig. Kommt doch REDEKE (3) zum Schluß, daß vorwiegend in den Herbst- und Wintermonaten und von April bis Juni Nahrung aufgenommen wird, fast nicht im März und ebensowenig im Sommer. HEYMAN (4) hat diese Angaben bestätigt. Unter etwa 18 Tieren, die in der Suspension verblieben, wurden fünf gefunden, die deutlich Tusche in Magen und Leber aufgenommen hatten. (Dies wurde erreicht bei Tieren, die 2, 4 und mehr als 8 Tage in Farbstoff-suspensionen gelebt hatten.) Bei den Stadien später als 2 Tage war die Farbe der Leber deutlich schwarz. Auf den Querschnitten der Magenlebergänge war die Tusche, mit Schleim zu schwarzen Fäden vereinigt, deutlich sichtbar; ebenso im Mageninhalt. Es zeigte sich, daß die Masse durch zwei Rinnen im Anfang des Oesophagus (Fortsetzungen der Rinnen zwischen den Mundlappen) dem Magen zugeführt worden war.

Unter fünf Austern, die in Carminsuspension gelebt hatten, wurde eine gefunden, die (während 7 Tagen) Carmin aufgenommen hatte und deren Leber sich ganz rötlich zeigte, ebenso der Inhalt der auf den Magen folgenden Darmschlinge¹⁾ (nachdem das Tier in Xylol übergeführt worden war).

Tiere, die zerriebenes Lackmuspulver in Magen und Leber zeigten, konnten nicht erhalten werden, wahrscheinlich, da die Zeit der Nahrungsaufnahme schon vorüber war, als diese Versuche (die letzten) angestellt wurden.

Vielfach wurden für diese Versuche Austern benützt, die im großen Aquarium die Schale etwas geöffnet hatten und diese bei Berührung schlossen. Solche Austern, die keinen Farbstoff in ihrem Darmkanal zeigten, hatten doch oft viele Schleimfäden reichlich mit Farbstoff vermischt abgesondert, oder diese Fäden zeigten sich an den Kiemen. Dies bewies, daß die Stoffe wohl den Kiemen entlang geströmt waren, vom Munde (bzw. Mundlappen) aber verweigert worden waren. Bei diesen Tieren konnte STENTAS Angabe bestätigt werden, daß die verweigerten Stoffe dem Mantelrande entlang gehen bis zu einem bestimmten Punkte, ungefähr in der Mitte des hufeisenförmigen Mantelrandes gelegen, um dann durch Zuklappen der Schalenhälften entfernt zu werden. So viel Farbstoff wurde derart wohl verarbeitet, daß die Suspensionen dadurch am nächsten Tage fast geklärt erschienen.

Nach kurzer makroskopischer Untersuchung wurden die verschiedenen Stücke des Darmkanals fixiert, teilweise mit gesättigter Sublimatlösung und 2%iger Essigsäure, teilweise mit ZENKERS Gemisch, in

¹⁾ Für die Anatomie der Auster siehe Abbildungen in CARAZZI (11), BIEDERMANN in Wintersteins Handbuch (S. 1025), RÖSELER und LAMPRECHT: Handb. f. Biol. Übungen. Zool. Teil. 1914. S. 292, 293.

Paraffin eingebettet und geschnitten. Der ganze Darmkanal mit Inhalt wurde bei einigen Tieren leicht als Ganzes herauspräpariert, indem der Enddarm auf der einen Seite und die auf den Magen folgende Darmschlinge an der anderen Seite vom Schließmuskel losgetrennt wurden und dann die Leber (worin alle übrigen Teile vom Darmkanal eingeschlossen liegen) mit anhaftender Darmschlinge und Enddarm herausgenommen wurde. Man kann dann an Schnitten parallel zur oberen (rechten) Schalenhälfte eine Übersicht über fast den ganzen Verlauf des Darmkanals bekommen. Von verschiedenen Färbungen wurde nach Vergleichung auf die Dauer diejenige mit Hämatoxylin-Eosin bevorzugt.

Die Betrachtung der Präparate ließ die Tusche im Oesophagus und Magen erkennen, aber auch in den Magenleberkanälen, Lebergängen, Leberblindsäckchen und bei genügender Dauer der Tuscheaufnahme in allen weiteren Darmteilen.

Bei stärkerer Vergrößerung wurde das Verhalten der Epithelien von den verschiedenen Darmteilen zu den Farbstoffkörnchen untersucht. Diese Epithelien sind beschrieben und abgebildet worden von CARAZZI (11, 12) und MAC MUNN (15); von FRENZEL (14) wurden sie nur kurz beschrieben; was ich in meinen Präparaten gesehen habe, stimmt durchaus mit diesen Beschreibungen überein. Das Epithel von Oesophagus, Magen mit seinen Ausbuchtungen, Mittel- und Enddarm (Abb. 7) besteht aus hohen schmalen Zellen mit länglichem Kern; das Verhältnis von Höhe und Breite dieser Zellen ist für die verschiedenen Darmteile charakteristisch. Alle haben Wimpersaum. Die Magenleberkanäle sind mit einer ähnlichen Zellart ausgekleidet, die bei *Ostrea* zum Unterschiede von *Mytilus* (6) ziemlich konstant im Verhältnis von Höhe und Breite ist. Die Lebergänge und Blindsäckchen endlich bestehen aus einer Schicht von untereinander gleichen Zellen, während in der Gastropodenleber drei Arten: Körner-, Ferment- (Secret-) und Kalkzellen vorkommen. Diese Leberzellen von *Ostrea* besitzen nach CARAZZI und MAC MUNN keinen Ciliensaum, während FRENZEL einen solchen findet, wiewohl er schwierig zu erkennen sei. In meinen Präparaten habe ich keinen Ciliensaum gesehen. Die Abgrenzungen der Leberzellen sind an der Seite des Lumens etwas unregelmäßig; regelmäßiger die am distalen Ende, wo auch der Kern sich befindet. Die Färbbarkeit des Plasmas nimmt vom distalen nach dem proximalen Ende ab.

Die Tuschepartikeln lagen in den engen Darmteilen bisweilen den Epithelien entlang, wo sie offenbar durch Flimmerbewegung weiter geführt wurden; so besonders im Oesophagus, in Magenleberkanälen und Darmschlinge; bisweilen waren sie zu einer ganz kompakten Masse zusammengeballt, so in Mittel- und Enddarm (Abb. 1 und 2). Im Magen war die Masse gleichmäßig mit Schleim vermengt oder auch an

einzelnen Stellen angehäuft. Auch in die Leberblindsäckchen war der Farbstoff durchgedrungen und hier waren die feinen Körnchen von den Leberzellen aufgenommen und je nach der Dauer der Fütterung zu kleineren oder größeren rundlichen Massen im Innern der Zellen aufgespeichert, gerade so wie LYST es bei seinen Mytiliden beobachtet hat (Abb. 3 und 3a). Eine bestimmte Vacuolenabgrenzung aber war nur



Abb. 1. Längsschnitt (parallel der flachen Schalenhälfte) durch den aus dem Körper genommenen Magen mit umliegenden Geweben. In Magen, Mitteldarm und Magenleberkanal sieht man durch Schleim zusammengehaltene Tuschemassen. Vergr. 4 X. In Abb. 1 und 2 bedeutet: *oe* Oesophagus; *m* Magenraum; *d₁* und *d₂* quergetroffener Mitteldarm (Tuscheinhalt!); *lg* Magenleberkanal; *l* Leber; *ds* Längsschnitt durch die Darmschlinge (mit Tuscheinhalt!); *g* Gonaden; *b* Bindegewebe.

selten und schwierig zu sehen. Dies mag mit der schon von FRENZEL stark betonte Schwierigkeit der Konservierung der Mitteldarmdrüse der Auster zusammenhängen. Die Aufnahme fand nicht durch alle Zellen gleichmäßig statt; während manche ganz mit Tusche gefüllt erschienen, zeigten viele andere keine Spur davon in ihrem Innern. Dieselben Resultate wurden an dem mit Carmin gefütterten Tiere beobachtet.

Nur ist Tusche für die Demonstration dieser Phagocytose beweisender, da Carmin sich besonders im Meerwasser immer etwas löst. Ein Übergang der Körnchen von den Epithelzellen in das angrenzende Bindegewebe, worin die Follikel eingebettet sind, war nie zu sehen. Auch Amöbocyten mit Tuschekörnchen beladen, die nach CARAZZIS Auffassung den Farbstoff transportieren sollen, konnte ich nie wahrnehmen.

In einem Mantelrand, der nach achttägigem Aufenthalt des Tieres in Suspension schwarze Färbung zeigte und Tusche aufgenommen haben könnte, sah man bei mikroskopischer Untersuchung zwar sehr viele Amöbocyten, aber keine Spur von Tuscheaufnahme.

Bei den Tuschepräparaten konnte vom Krystallstiel nichts beobachtet werden. Dieser verschwindet sehr bald, wenn die Tiere ins Inland verschickt werden und wurde nur bei zwei von den vielen dem Aquarium entnommenen Tieren angetroffen. Beim „Carmintier“ wurde im Magenquerschnitt eine Struktur gesehen, die das Ende eines in Bildung begriffenen Krystallstiels darstellen könnte. Es war eine dreieckige kompakte Masse, die viele Körnchen eingeschlossen hatte und sich stärker färbte als der übrige Mageninhalt (Abb. 4). Die

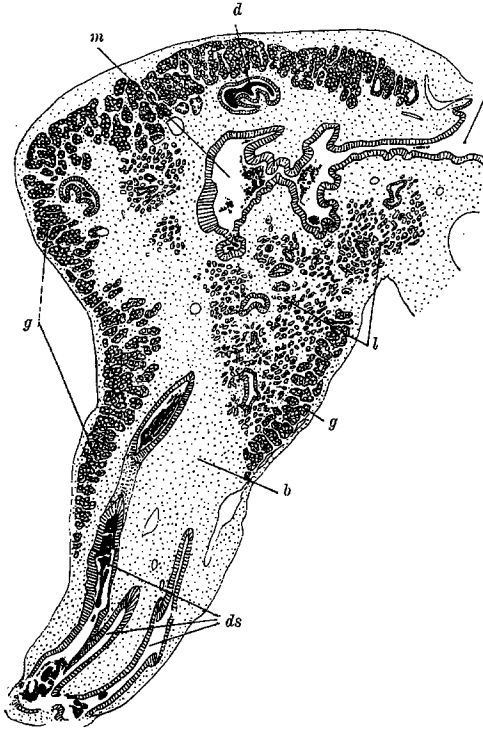


Abb. 2. Gleichartiger Querschnitt wie Abb. 1, der zum Teil die auf den Magen folgende Darmschlinge (im Text erwähnt) getroffen hat. Vergr. 4X.

Betrachtung von Querschnitten durch die Darmschlinge zeigte nämlich ab und zu kreisförmige Gebilde, die nicht konzentrisch geschichtet, sondern mit unregelmäßigen Löchern versehen waren, und dies führt zur Vermutung, daß der Stiel zuerst stark rückgebildet, und nun wieder von neuem geformt wurde.

Hiermit war also gezeigt, daß die aufgenommenen Farbstoffe wenigstens teilweise vom Magen durch die Magenleberkanäle bis in die Leberfollikel geführt werden und daß die Epithelzellen der Follikel imstande sind, unlösliche Körnchen zu phagocytieren. Niemals war eine derartige Körnchenaufnahme zu sehen in den Zellen von Oesophagus, Magen, Magenleberkanälen, Mittel- und Enddarm.

Es fragt sich nun, von welcher Bedeutung diese Fähigkeit der Phagocytose der Leberzellen für die Verarbeitung der wirklichen Nahrung ist. Man kann kaum annehmen, daß die Leberzellen bei Berührung mit den unlöslichen Kohlenteilchen (woraus bekanntlich die echte chinesische Tusche besteht) plötzlich befähigt werden sollten, diese Teilchen in ihrem Innern zu speichern, ohne jemals vorher in ihrem Leben eine derartige Funktion ausgeübt zu haben. Als eine Phagocytose von Fremdkörpern kann man die Erscheinung nicht auffassen. Diese hätte im Darmkanal auch gar keinen Sinn; Teilchen, die zufälligerweise in den

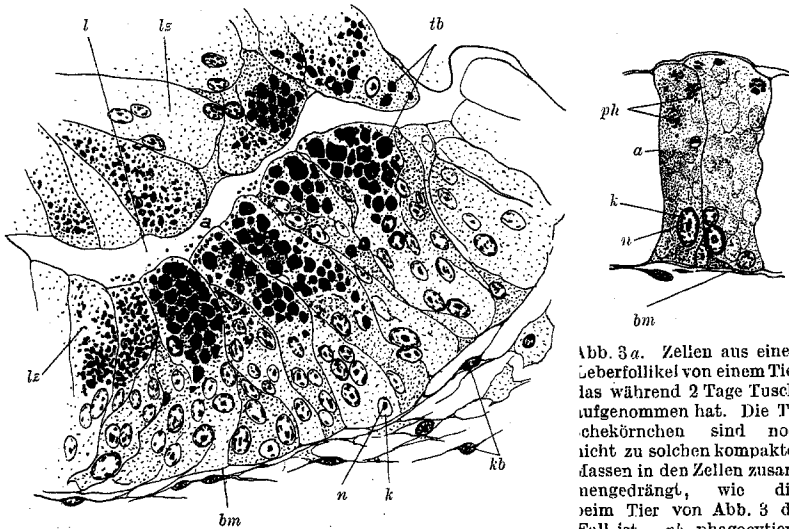


Abb. 3. Teil eines Schnitts durch einen Leberfollikel bei einem Tier, das während 4 Tagen Tusche aufgenommen hat. *l* Lumen des Follikels; *kb* Bindegewebskerne; *bm* Basalmembran; *lz* Leberzellen; *k* Kerne der Leberzellen; *n* Nucleoli; *tb* zusammengeballte Tuschmassen in den Leberzellen. Bei *a* sieht man die feinen Tuschekörnchen außerhalb der Zelle und im Zellinnern feine Körnchen, die gerade die Membran passiert haben und noch nicht zusammengeballt wurden. Vergr. Zeiss Oc. 2 \times , hom. Imm. $\frac{1}{12}$ ''.

Abb. 3a. Zellen aus einem Leberfollikel von einem Tier, das während 2 Tage Tusche aufgenommen hat. Die Tuschekörnchen sind noch nicht zu solchen kompakten Massen in den Zellen zusammengedrängt, wie dies beim Tier von Abb. 3 der Fall ist. *ph* phagocytisierte Tuscheteilchen; *k* Zellkern; *n* Nucleolus; *bm* Basalmembran. *a* ungefähre Grenze zwischen dem phagocytisierenden und nicht-phagocytisierenden Zellteil.

Darmkanal gelangen und deren Entfernung wünschenswert ist, können viel schneller und bequemer den Darm entlang entfernt werden, als durch eine Phagocytose. Vielmehr muß man annehmen, daß die Farbstoffe, die doch auf Mundlappen usw. eine Art von Nahrungsreiz ausgeübt haben müssen, da die Auster wählerisch in ihrer Nahrung ist, nun auch auf die Leberzellen einen derartigen Einfluß haben. Daß die Phagocytose von Nahrungsteilchen eine normale Eigenschaft dieser Zellen ist, ist durchaus in Übereinstimmung mit unseren Kenntnissen von der Ernährung bei den in der Literaturübersicht angeführten Tiergruppen. Aber dann erhebt sich die Schwierigkeit, daß gerade die

Austernahrung vorwiegend aus Diatomeen besteht und daß diese erstens von einem harten Kieselpanzer umgeben und zweitens vielfach größer als die Leberzellen sind. Muß man sich vorstellen, daß ganze Diatomeen phagocytiert werden, oder bloß ihr Inhalt, der in irgendeiner Weise von der Schale befreit worden ist?

Um zu entscheiden, ob die normale Nahrung auch phagocytiert wird, wurden einige Austern in einem kleinen Aquarium gehalten, in das eine ziemlich große Menge frisch von der zoologischen Station im

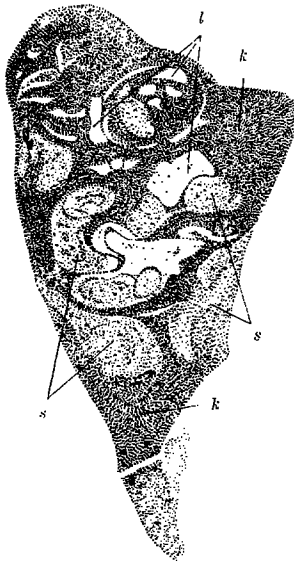


Abb. 4. „Krystallstielmasse“ aus dem quer durchschnittenen Magen beim „Carmin-tier“. *k* Carminkörnchen; *s* Schleim; *l* Lücken in der Masse (von der Rückbildung des Stiels herrührend?). Man beachte, wie schön die Carminkörnchen durch Schleim zusammengehalten werden. ebenso wie die Microorganismen der Abb. 5 und 6. Vergr. 45 X.

Holder gesandtes Plankton gebracht worden war. Beim Anfang des Versuches waren die verschiedenen Planktonorganismen lebend im Aquarium anwesend. Nach drei und fünf Tagen wurden die Austern herausgenommen. Von einer wurde der Mageninhalte herauspipettiert. Dieser gab saure Reaktion auf Lackmus- und keine Reaktion auf Kongorotpapier; die Farbe war goldgelb. Viele Diatomeen, meistens mit kontrahiertem Inhalt, auch einzellige grüne Algen und einige Protozoen wurden darin gefunden. Deutlich sichtbar war es, daß die aufgenommene Masse auch in die Mündungen der Magenleberkanäle eingedrungen war und diese ganz ausfüllte. Ein daraus genommener Tropfen war von gleicher Beschaffenheit wie der übrige Mageninhalte. Ein Krystallstiel wurde nicht angetroffen. Querschnitte wurden nach Fixierung und Einbettung angefertigt in Richtungen senkrecht zur Ebene der Schale und parallel dazu. Diese Querschnitte wurden verglichen mit solchen eines Tieres, das 2—3 Wochen in Seewasser gelebt hatte, welches arm an Planktonorganismen war. Bei gefütterten Tieren

waren Diatomeen und Algen deutlich im Querschnitte von Magen und Mitteldarm zu sehen. Im Magen zeigte sich ein Gebilde, wie es auch nach Carminfütterung gesehen worden war und das vielleicht das in den Magen hineinragende Ende des Krystallstieles darstellt. Es war stark färbbar und hielt viele Diatomeen, Algen und andere Organismen eingeschlossen (Abb. 6). Diese Organismen waren auch eingebettet in einen viel feineren Schleim, der den ganzen Magen erfüllte. Schnitte durch den für den Krystallstiel bestimmten Darmteil zeigten ebenso wie beim

carmingefütterten Tier, daß der Stiel vermutlich stark rückgebildet worden und nun von neuem in Bildung begriffen war. Ein Teil der Magenwand (Abb. 5) war mit einer kompakten Schicht bedeckt, die in geringer Entfernung vom Epithel lag; dieses erschien dort wie deformiert, vermutlich durch die Absonderung des „dreizackigen Pfeiles“ (flêche tricuspidè), wie diese Schicht von vielen Autoren genannt wird. In all diesen Darmteilen ist die Hauptmasse der Nahrung schön zusammengehalten. Im Gegensatz zu ungefütterten oder mit Farbstoff genährten Tieren zeigten nun die Leberzellen dieser Austern zahlreiche grüne

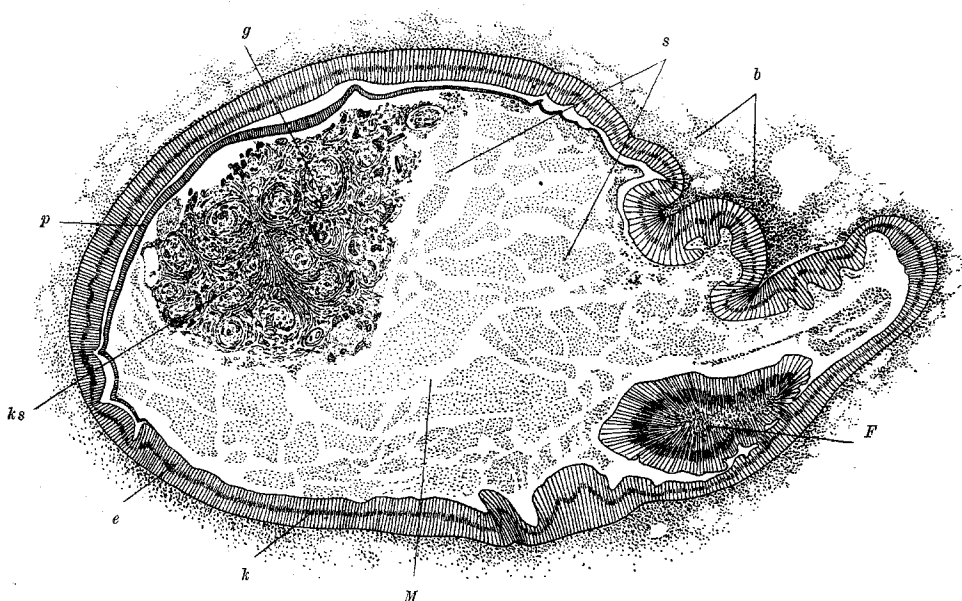


Abb. 5. Querschnitt durch den Magen (senkrecht zur flachen Schale) bei einer Auster, die während 5 Tagen Plankton aufgenommen hat. *b* umliegendes Bindegewebe; *e* Magenepithel; *k* Reihe von Kernen; *p* sogen. dreizackiger Pfeil, darunter das Epithel etwas deformiert; *ks* stark färbbare Schleimmasse, die vielleicht das in den Magen hineinragende Krystallstielende ausmacht, mit grünen Einschlüssen (*g*); *s* weniger färbbare Schleimmassen; *M* Magenraum; *F* Falte in der Magenwand. Vergl. 20 X.

Einschlüsse von sehr unregelmäßiger Form. Gegen Hämatoxylin-Eosinfärbung kommt das Grün am schönsten zur Geltung. Ganze Diatomeen habe ich aber in diesen Zellen nicht eingeschlossen gesehen; einige grüne Algen schienen wohl im ganzen aufgenommen worden zu sein. Der Enddarm umschloß einen runden Excrementeylinder, der von einer Schleimhülle umgeben war (Abb. 7); grüne Einschlüsse und einzelne Diatomeen kamen darin vor. Wahrscheinlich wird bei so reichlicher Ernährung ein Teil der aufgenommenen Organismen direkt durch den Darm entleert und nicht ausgenützt.

Da die Diatomeen Hauptbestandteil der Nahrung sind und ihre Chromatophoren braune Farbe haben, wird man hier einwenden, daß die Einschlüsse der Leberzellen, falls sie wirklich phagocytierte Nahrungsbestandteile sein sollten, ebenfalls braune Farbe zeigen müßten. Dennoch habe ich die grüne Farbe der Einschlüsse gesehen. Eine kurze Bemerkung über den Diatomeenfarbstoff möge zeigen, daß dies keineswegs ein Widerspruch zu sein braucht. MOLISCH hat die Farbstoffe von Diatomeen und Braunalgen studiert (22). Er nimmt an, daß nur ein einziger Stoff für die Farbe von Braunalgen und Diatomeen verantwortlich ist (sogenanntes Phaeophyll).

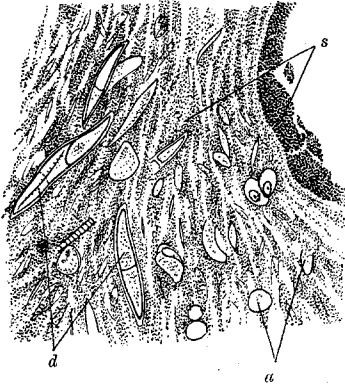


Abb. 6. Teil des als Krystalstiellmasse gedeuteten Schleimes von Abb. 5 stark vergrößert; *d* Diatomeen; *a* einzellige grüne Algen; *s* stark färbare Schleimmasse. Vergr. $4 \times D$.

Tötet er die Diatomeen und Braunalgen mit heißem Wasser, heißer Luft, Alkohol oder Äther, so läßt sich ein brauner Farbstoff leicht (mit kaltem Alkohol) extrahieren und ein grüner Farbstoff, nur mit heißem Alkohol extrahierbar, bleibt in den Organismen zurück. MOLISCH hat dieses Resultat einer chemischen Spaltung des braunen Farbstoffes in zwei Komponenten zugeschrieben. Die Untersuchungen von WILLSTÄTTER und PAGE für Braunalgen (23) haben diese Ansichten von MOLISCH nicht bestätigt. Nach ihren Untersuchungen gibt es in den Braunalgen Chlorophyll (α und β), Karotine, Xanthophyll und außerdem noch ziemlich viel Fukoxanthin. Die drei letzten gelblichen Pigmente überdecken die grüne Chlorophyllfarbe. Diatomeen sind bei diesen Studien nicht untersucht worden.

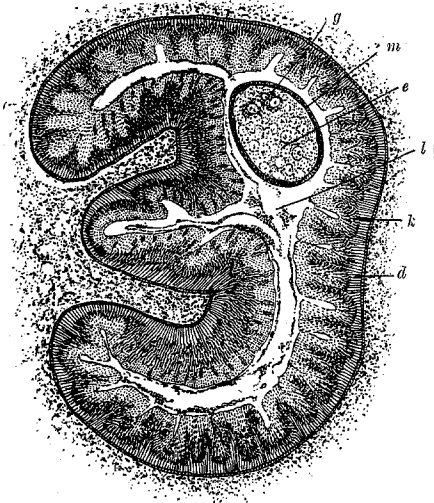


Abb. 7. Querschnitt durch den Enddarm einer mit Plankton gefütterten Auster. *a* Darmepithel mit Kernen (*b*); *c* Darmlumen; *e* Excrementcylinder mit Einschlüssen (*g*) und umgeben von einer Membran (*m*). Vergr. $40 \times$.

Obleich es auf der Hand liegt anzunehmen, daß dort ähnliche Verhältnisse gelten werden, weiß man hierüber nichts. Doch die Beobach-

Obleich es auf der Hand liegt anzunehmen, daß dort ähnliche Verhältnisse gelten werden, weiß man hierüber nichts. Doch die Beobach-

tung MOLISCHS, daß man jedenfalls beim Töten von Diatomeen einen leicht extrahierbaren braunen Farbstoff und einen schwerer extrahierbaren grünen unterscheiden kann und daß die Diatomeen nach dem Tode grün aussehen, gibt uns eine befriedigende Erklärung für das Auftreten grüner Einschlüsse in den Zellen. Jedenfalls wird beim Fixieren und bei der Nachbehandlung der braune Farbstoff extrahiert worden und eine grüne Farbe zurückgeblieben sein. Wahrscheinlich geschieht dies aber auch schon nachdem die Diatomeen im Darmtraktus den Tod gefunden haben. Das Austreten des leicht extrahierbaren Farbstoffes im Magen würde dann eine schöne dunkel-goldgelbe Färbung veranlassen, die REDEKE stets an einem Tropfen Mageninhalt einer wohlgenährten Auster beobachtete und die auch bei meinen gefütterten Austern auftrat. Ich habe leider nicht Zeit gehabt diese Annahmen genau zu prüfen (wie auch in Aussicht genommene Untersuchungen über Enzyme wegen Zeitmangel unterbleiben mußten). Ich erwähne sie aber um zu zeigen, daß einige Einwände, die man der Lehre von der Phagocytose entgegenhalten könnte, unter Zuhilfenahme einiger bekannter Tatsachen sich sehr wohl widerlegen lassen. Gleichfalls habe ich die Resultate der Fütterung mitgeteilt, obwohl diese leider nur auf wenigen Versuchen beruhen, weil sie lehren, daß der Weg der Nahrung der gleiche ist wie der der angewandten Farbstoffe und auch das Auftreten der grünen Einschlüsse erwähnenswert ist; doch möchte ein strenger Beweis der Aufnahme von Diatomeeninhalten durch die Zellen der Mitteldarmdrüse künftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben. In einem letzten Abschnitte will ich nun noch meine Resultate im Zusammenhange mit den Beobachtungen und theoretischen Ausführungen der älteren Literatur vortragen.

Das Vorkommen von grünen Einschlüssen in der Leber von Austern und anderen Lamellibranchiaten ist von vielen Autoren bereits beobachtet und beschrieben worden und über die Bedeutung dieses „tierischen Chlorophylls“ gingen die Meinungen weit auseinander. Diese grünen oder bräunlichen Körner sah FRENZEL bei *Ostrea* in seinen Zupfpräparaten (14). MAC MUNN meinte einzellige Algen zu sehen im Leberepithel¹⁾ (15), nahm später aber seine Behauptung nach FRENZELS Kritik (14) zurück (16). Er spricht von Enterochlorophyll und findet anfangs (15) für einen Chloroformextrakt der Leber dasselbe Spektrum wie für *Primulachlorophyll*, in einer späteren Arbeit (17) die Ähnlichkeit des Enterochlorophyllspektrums mit dem einer angesäuerten Chlorophylllösung. Zu ähnlichen Schlüssen kommen DASTRE und FLORESCO in zwei Arbeiten (18, 19) und die drei letztgenannten Autoren

¹⁾ Was nach der gegenwärtigen Auffassung der „Leber“ sehr gut möglich ist.

schließen nach anfänglichem Verneinen in ihren letzten Arbeiten, daß die grünen Farbstoffe aus der Nahrung stammen¹⁾. Zu diesem Schluß trugen u. a. Befunde bei an *Anodonta*, die, frisch gefangen, einen grünen Farbstoff aus sich extrahieren ließ und, längere Zeit in fließendem Wasser gehalten, keinen Farbstoff mehr aufwies. Daß *Helix* selbst nach dem Winterschlaf noch grüne Einschlüsse zeigte, widersprach anfangs dieser Annahme, aber es konnte gezeigt werden, daß bei Fütterung nach dem Winterschlaf mit chlorophyllloser Nahrung das Grün endlich verschwindet und bei Aufnahme von grünen Nährstoffen wieder zurückkehrt. Nur die Bedeutung dieser Ansammlung und die Art und der Weg der Aufnahme blieben ungeklärt, bis die Farbstofffütterung von LIST bei *Mytilus* (6), später von JORDAN bei *Helix* (21) und ENRIQUES' Wahrnehmungen bei *Aplysia* (20) uns auf die richtige Spur brachten.

Alle oben erwähnten für *Ostrea* wahrgenommenen Tatsachen werden leicht verständlich, wenn man auch für *Ostrea* die Phagozytose vom Protoplasmahalt der Diatomeen mit ihren Chromatophoren durch die Leberzellen der Auster annimmt. Es wird wohl nicht leicht gelingen, diese Erscheinung in vivo zu demonstrieren, wegen der außerordentlichen Zartheit dieses Lebergewebes, aber wenn man die bewiesene Phagozytose der Tusche kombiniert mit dem Auftreten von grünen Einschlüssen in den Leberzellen (und nur dort!²⁾ bei reichlicher natürlicher Ernährung, dann kann man kaum daran zweifeln, daß die Ernährung der Auster durch Phagozytose zustande kommt. Diese Vorstellung stimmt auch durchaus überein mit dem fast völligen Fehlen einer Wirkung des Austernmagensaftes auf Fibrin und koaguliertes Hühner-eiweiß. Zwar behauptet HEYMANN, der diese Tatsache fand, daß die Hemmung der Enzymwirkung in vitro durch die entstehenden Aminosäuren die Ursache der geringen Wirkung sei, aber es bleibt dann doch völlig unbegreiflich, warum man z. B. mit dem Magensaft des Krebses (*Astacus fluviatilis*) in vitro eine sehr energische Fibrinverdauung erhalten kann.

Die Vorstellung, die man sich auf diese Weise von der Ernährung der Auster machen kann, widerspricht derjenigen, welche sich HEYMANN macht. HEYMANN verwirft (l. c. S. 80 u. 81) die Lehre von der Phagozytose mit den folgenden Worten³⁾: „Die Diatomeen, die die eigentliche Austernahrung im engeren Sinne des Wortes ausmachen, sind linear

¹⁾ Bloß ENRIQUES (20) findet spektroskopisch kein Chlorophyll in der *Ostrea*-Leber, aber es kann dies an der Zeit der Untersuchung liegen.

²⁾ Das widerspricht genügend der Annahme MAC MURRIS (17), der behauptet, daß die grünen Stoffe vom Darmepithel aufgenommen und von dort der Leber zugeführt werden sollten.

³⁾ Frei übersetzt.

wenigstens viermal größer als die Leberzellen und können deshalb bestimmt nicht von diesen ganz aufgenommen werden, weil diese Zellen nicht aus amöboidem Protoplasma bestehen, sondern aus einer festen Substanz, die ihre Form nicht ändern kann. Ebenso wenig kann angenommen werden, daß das Protoplasma der Diatomeen, sei es lebend oder tot, die Zellen verläßt und in die Leberzellen eindringt, denn wäre dies der Fall, so würde dies auch mit den Chromatophoren geschehen, von welchen bekannt ist, daß sie nicht in die Leberzellen eindringen; offenbar wird dies von der Wand der Diatomeen verhindert. Für andere feste Inhaltsbestandteile der Diatomeen wird dasselbe gelten. Die Theorie der Phagocytose ist also offenbar unrichtig.“ Dann gibt der Autor eine spekulative Theorie der Eiweißverdauung, die er durch so gut als keine Tatsachen stützt. Er nimmt an (l. c. S. 81, 82, 83), daß die Resultate LISTS, der, wie HEYMANN sagt, mittels Lackmuspulver fand, daß bestimmte Zellen sauer, andere alkalisch reagieren (LIST ist hier überdies unrichtig zitiert; er hat gefunden, daß bloß einzelne Stellen in derselben Zelle Reaktionsunterschiede zeigen; LIST l. c. S. 291), auch für Austern gelten, ohne eine Untersuchung darüber anzustellen.

Aus diesem nicht einmal wahrgenommenen Reaktionsunterschied schließt er auf die Anwesenheit eines pepsinartigen Enzyms in den sauren Zellen, welches Enzym in das Lumen der Follikel abgeschieden werden und dort den Diatomeeninhalte zu Albumosen und Peptonen abbauen sollte. Diese Stoffe dringen in die Leberzellen ein und werden dort von den alkalischen Zellen, die Trypsin enthalten sollen, weiter abgebaut. Aus diesen Spaltungsprodukten wird Reserveeiweiß geformt, das in Zeiten, in denen keine Nahrungsaufnahme stattfindet, wieder aus den Zellen ausgeschieden und dem Magen zugeführt wird, worauf es von den Darmzellen wieder aufgenommen und von dort den übrigen Körperteilen zugeführt werden kann. Warum ein Reserveeiweiß nicht von den Leberzellen ins Blut geraten kann und ein so langer und ungewöhnlicher Weg eingeschlagen wird, um dieses Reserveeiweiß auszunützen, bleibt unklar. In der Tat liegt nur eine beobachtete Tatsache dieser Theorie zugrunde, nämlich diese, daß HEYMANN auch in Hungerzeiten reichlich Eiweiß im Magen nachweisen konnte und dies sollte dann Eiweiß sein, das auf dem Wege von der Leber zum Darne angetroffen wird. Daß auch in Hungerperioden im Mageninhalt von irgendeinem Tiere Eiweißreaktion erhalten werden kann, wird den vergleichenden Physiologen kaum verwundern: Wir kennen nämlich kein Tier, bei dem die Secrete der Verdauungsdrüsen kein Eiweiß enthalten und kaum ein wirbelloses Tier, höher als die Plattwürmer, in dessen Magen auch während des Hungers solche Secrete fehlen! Die einzige Stütze der Theorie fällt somit fort, abgesehen davon, daß diese, auch wenn

die LISTschen Resultate nicht für Austern gelten sollten, keineswegs eine befriedigende Erklärung der Austerernahrung gibt¹⁾).

Im Vorhergehenden wurde nun aber bewiesen, daß die Austern bei Farbstofffütterung sich ebenso verhalten wie der von LIST untersuchte *Mytilus galloprovincialis* und durch ein paar Versuche wahrscheinlich gemacht, daß auch der Diatomeeninhalt selbst von den Zellen der Mitteldarmdrüse aufgenommen wird. Auf Grund dieser Versuche kann man es für sehr wahrscheinlich halten, daß die Nahrung der Auster, insoweit sie aus Eiweiß besteht, von den Zellen der Mitteldarmdrüse durch Phagoocytose (hauptsächlich in Form von Diatomeeninhalt) aufgenommen wird. Zur gleichen Zeit erklärt diese Vorstellung in befriedigender Weise die Bedeutung der grünen Einschlüsse, die seit lange in den Zellen der Leber beobachtet worden sind.

Die Fette und Kohlehydrate können von den bei den Lamcllibranchiaten besonders im Krystallstiel aufgefundenen Enzymen gespalten werden. Ob diese Spaltungsprodukte auch von den Leberzellen (die bei *Ostrea* anscheinend nicht differenziert sind) oder von dem Darms oder von beiden aufgenommen werden, darüber werden weitere Versuche entscheiden müssen²⁾).

Die Diatomeen wurden von mir nicht im Innern der Zellen gesehen und so bleibt es eine offene Frage, wie die Parzer im Darmkanal ihres Inhaltes beraubt werden. Will man sich hiervon eine Vorstellung machen, so könnte man annehmen, daß die Diatomeen, die bereits im Magen ihren Inhalt kontrahiert zeigen, durch Autolyse von ihrer Schalenwand losgelöst werden und daß dann durch die Fortbewegung und die unvermeidlichen Stöße in den engen Magenleberkanälen die Schalenhälften leicht auseinander gehen können. Tatsächlich besitzen die Diatomeen proteolytische Enzyme, die nach dem Tode Autolyse veranlassen können, da sie nach KÜSTER (24) bei Kultur auf Gelatinenährboden diese verflüssigen³⁾).

¹⁾ Besonders muß hier auch noch betont werden, daß man nicht auf Grund einer sauren oder alkalischen Reaktion, zumal auf Lackmus (!), an einer bestimmten Stelle auf die Anwesenheit von Pepsin oder Trypsin schließen darf! (25). Pepsin ist überdies bei keinem einzigen Invertebrat nachgewiesen worden.

²⁾ Bei den Schnecken (*Helix pomatia* z. B.) wird die Nahrung phagocytär in der „Leber“ aufgenommen, dagegen können gelöste Stoffe (als solche kommen bei *Helix* nur Kohlehydrate und Salze in Frage) durch den Darm *diffundieren* (nicht resorbiert werden: JORDAN und BEGEMANN [26a]).

³⁾ Herr Dr. REDEKE, der etwa 140 Austernmagen auf ihren Inhalt untersuchte, hat mir freundlichst erlaubt mitzuteilen, dabei oft beobachtet zu haben, daß die Schalenhälften der Diatomeen im Austernmagen voneinander getrennt waren. Wenn man sich diese Trennung nun auch noch nicht erklären kann, so ist doch die Frage, wie der Inhalt der Diatomeen in die Phagocyten gelangen kann, gelöst, da eben tatsächlich die eröffneten Diatomeen im Austernmagen gefunden wurden.

Zum Schlusse habe ich Herrn Prof. H. JORDAN meinen herzlichen Dank auszusprechen für seine Anregung zur Bearbeitung dieses Themas und vielfache Unterstützung dabei; vielen Dank schulde ich auch Herrn Dr. H. C. REDEKE, Direktor der zool. Station im Helder für Sendungen von Austern und Plankton.

Literatur.

1. MÖBIUS: Über die Tiere der Schleswig-Holsteinschen Austernbanken. Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss., 16. Febr. 1893. — 2. LOTSY, JOHN P.: The food of the oyster (etc.). Report of the U. S. comm. of fish and fisheries Part 19, 375—386. 1895. — 3. REDEKE in HOEK, P. P. C.: Rapport over de oorzaken van de achteruitgang in hoedanigheid van de Zeeuwsche oester. Byl. B Het voedsel der Z. oester. 1902. — 4. HEYMANN, J. A.: De voeding der oester. 's Gravenhage 1914. (Diss. Delft.) — 5. STENTA, M.: Arb. a. d. zool. Inst. d. Univ. Wien 14. 1903. — 6. LIST, TH.: Die Mytiliden des Golfes von Neapel. Fauna u. Flora Neapel Nr. 27. — 7. COUPIN, H.: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences, Paris 130. 1900. — 8. MITRA, S. B.: Quart. journ. of microscop. science, N. S. 44. 1901. — 9. VAN RYNBERK: Arch. ital. de biol. 99, fasc. 3. — 10. CARAZZI, D.: Rassegna delle Science Biologiche, Marzo-Aprile 1920. Nr. 3—4. (Zusammenfassung früherer Arbeiten.) — 11. Ders.: Contributo all'istologia e alla fisiologia dei Lamellibranchi. Mitt. a. d. zool. Stat. zu Neapel 12 (1896—97). — 12. Ders.: Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol. 14. 1897. — 13. PÜTTER, A.: Die Ernährung der Wassertiere und der Stoffhaushalt der Gewässer. Jena 1909. — 14. FRENZEL, J.: Micrographie der Mitteldarmdrüse der Mollusken. Nova Acta Leop. 48. 1886. — 15. MAC MURRIN: Proc. of the roy. soc. of London (B) 35. 1883. — 16. Ders.: Philos. transact. 177. 1886. — 17. Ders.: Ebenda (B) 193. 1900. — 18. DASTRE, A. et FLORESCO, N.: Arch. de physiol. norm. et path. 30. 1898. — 19. DASTRE, A.: Journ. de physiol. et de pathol. gén. 1. 1899. — 20. ENRIQUES, P.: Mitt. d. zool. Stat. zu Neapel 15. 1901. — 21. JORDAN, H.: Arch. néerl. de physiol. II. livr. 4. 1918. — 22. MOLISCH, H.: Botan. Ztg. 1905. — 23. WILLSTÄTTER, R. u. PAGE, H. J.: Liebigs Ann. d. Chem. 404, 237. 1914. — 24. KÜSTER, E.: Anleitung zur Kultur der Microorganismen. 1921. — 25. JORDAN, H.: Biol. Zentralbl. 27, 375. 1907. — 26. YONGE, C. M.: Brit. journ. of exp. biol. 1, October 1923. — 26a. JORDAN, H. u. BEGEMANN, H.: Über die Bedeutung des Darmes von *Helix pomatia*. Zool. Jahrb., Abt. f. allg. Zool. u. Physiol. 38. 1921. — Handbücher: 27. Von FÜRTH, O.: Vergleichende chem. Physiologie der niederen Tiere. Jena 1903. — 28. JORDAN, H.: Vergleichende Physiologie wirbelloser Tiere. Bd. I: Die Ernährung. Jena 1913. — 29. WINTERSTEIN, H.: Handbuch der vergl. Physiologie. Bd. II: Physiologie des Stoffwechsels. 1. Hälfte v. W. BIEDERMANN. Jena 1911.