

Z Katedry Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS

Kierownik: prof. dr Zbigniew Lorkiewicz

Wincenty DROŻAŃSKI

Wpływ filtratu hodowli bakteryjnych na ekscystację małych ameb wolnożyjących

Влияние фильтрата бактериальных культур на эксцистиацию амёб,
изолированных из естественных условий

The Influence of Culture Filtrates of Bacteria on the Excystment of Small
Free-living Amoebae

WSTĘP

Przejsie ameby ze stanu spoczynkowego w formę troficzną uzależnione jest w znacznym stopniu od czynników środowiskowych, takich jak wilgotność, zasolenie podłoża, *pH*, temperatura, stopień natlenienia, obecność czynników redukujących i skład chemiczny podłoża (3, 6, 8, 19). Do ekscystacji niezbędne są w środowisku pełzaków także żywe bakterie (6, 8, 9, 12, 18). Ekscystacja ameb glebowych może także zachodzić pod wpływem bakteryjnych produktów metabolizmu, dyfundujących do podłoża (12). Singh i współprac. (18), badając naturę czynnika stymulującego ekscystację *Schizopyrenus russelli*, zawartego w komórkach *Aerobacter aerogenes*, wykazali, że czynnik ten jest termolabilny oraz dyfunduje przez błony kolodionowe. Wyniki badań Singha (19) i Drożńskiego (7) wskazują, że ekscystacja ameb zachodzi pod wpływem wodnych wyciągów z bakterii, głównie frakcji aminokwasów.

Celem pracy było zbadanie wpływu przesączy hodowli bakterii na ekscystację form przetrwalnych ameb oraz uzyskanie frakcji przesączy aktywnej w tym procesie.

MATERIAL I METODY

Organizmy: Do badań użyto *Hartmannella rhyssodes* Singh, *Acanthamoeba castellanii* Douglas Volkonsky* *Schizopyrenus russelli* Singh**, *Didasculus Thorntoni* Singh** oraz 41 nie oznaczonych ameb wolnożyjących, z których 19 szczepów wyizolowano z gleby, a 22 wyodrębniono ze zbiorników wodnych. Ponadto do badań użyto następujących gatunków bakterii: *Aerobacter aerogenes* — szczepy 25 i 26, *Escherichia coli* — szczepy 23 i 24, *Proteus vulgaris*, *Proteus O*x19, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* — szczepy 9, 10 i 12, *Serratia marcescens*, *Vibrio cycloides*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* — szczepy 5 i 25, *Bacillus cereus* v. *thuringensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Proactinomyces* sp., *Corynebacterium equi* oraz dwie pałeczki gramujemne — szczepy 96 i 115 wyisobnione z gleby.

Otrzymanie monoksenicznej hodowli ameb. W celu uzyskania monoksenicznej hodowli poszczególnych szczepów ameb wykorzystano zdolność rozpełzania się pelzaków po podłożu stałym (4, 16, 17, 21). Szczepy ameb, które wykazywały słabą zdolność migracji po agarze, oczyszczano od bakterii przy pomocy antybiotyków (11, 14, 19), dodając do podłoża 500 γ streptomycyny i 500 j. penicyliny na ml. Do wyprowadzenia czystych kultur służyły pojedyncze cysty, izolowane pod mikroskopem. Oczyszczone szczepy ameb przechowywano na skosach agaru nieodżywczego (1,5% agaru, 0,5% NaCl) w obecności *A. aerogenes*.

Przygotowanie cyst. Gęstą zawiesinę cyst z monoksenicznej hodowli 45 szczepów ameb nanoszono na płytki z agarem nieodżywczym, zawierającym 500 γ streptomycyny i 500 j. penicyliny na ml, i inkubowano w ciągu 5—3 dni w temp. 22°C. Następnie cysty splukiwano płynem fizjologicznym i sprawdzano ich jałowość. Ponieważ cysty 7 szczepów ameb kiełkowały na tym podłożu, a formy troficzne zamierały z braku pokarmu, dla uzyskania bezbakteryjnej zawiesiny cyst na agarze nieodżywczym z antybiotykami dodawano zawiesinę komórek *A. aerogenes*. W tych warunkach cysty kiełkowały, a formy troficzne namnażały się i ponownie encystowały.

Do doświadczeń nad ekscystacją używano 15—20-dniowych cyst przemytych przez 3-krotne wirowanie w płynie fizjologicznym w czasie 2 min. przy 500 obr./min. Cysty ameb, które po wykiełkowaniu nie pozostawiały osłon okrywających, oczyszczano od żywych form troficznych 0,5% chlorowodorkiem emetyny (19). Jałowe pod względem bakteryjnym i pozbawione form troficznych zawiesiny cyst nanoszono po 0,1 ml do małych probówek i dodawano badany czynnik stymulujący ekscystację. Liczbę ameb ekscystujących podano w procentach, obliczając stosunek cyst pełnych do pustych albo cyst pełnych do form troficznych po oznaczonym czasie inkubacji. W tych warunkach formy troficzne nie namnażają się (19).

Przygotowanie przesączy z hodowli bakterii. Przesącze uzyskiwano z hodowli bakterii na:

a) zmodyfikowanej pożywce K wapińskiego (13) o składzie: 4 g NaCl, 5 g Na_2HPO_4 , 0,5 g cytrynianu amonu, 0,5 g MgSO_4 , 0,05 g Zn SO_4 , 10 g glukozy, 3 g NH_4 , 2NO_3 , H_2O do 1000 ml, pH 7,2;

* Otrzymano od prof. dr W. Balamutha, Department of Zoology, University of California, Berkeley.

** Otrzymano od prof. dr B. N. Singha, Central Drug Research Institute, Lucknow, India.

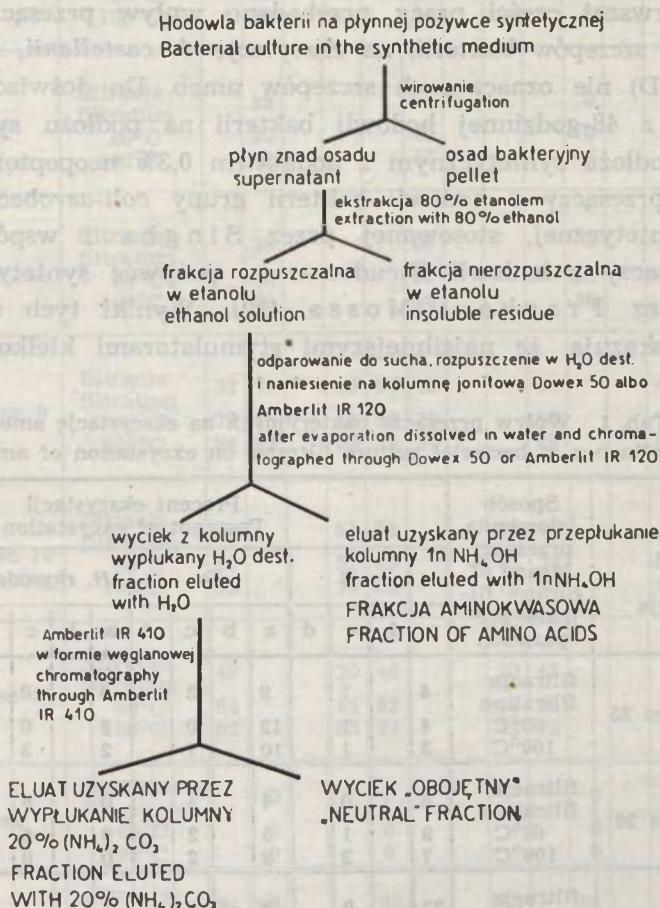
b) zmodyfikowanej pożywce Kwapińskiego, w której azotan amonu zastąpiono 3 g neopetonu Difco;

c) pożywce stosowanej przez Singha i współprac. (19) do hodowli bakterii z grupy coli-aerobacter;

d) pożywce Franka i Mossa (10), do której dodano kwas dl-glutaminowy jako jedyne źródło azotu.

Szczepy bakterii, z wyjątkiem kilku szczepów glebowych, inkubowano w temp. 37°C w czasie 48 godz. Następnie hodowle wirowano przy 6000 obr./min. Uzyskany płyn jałowiono, sącząc go przez świece Chamberlanda L5 i dzielono na 3 części. Jedną część używano bezpośrednio do doświadczeń, drugą ogrzewano w czasie 1 godz. w temp. 60°C, trzecią — w czasie 1 godz. w temp. 100°C.

Fracjonowanie przesączy bakteryjnych. W celu znalezienia w przesączach bakteryjnych związków czynnych, stymulujących ekscystację form przetrwalnych ameb, użyto przesączy hodowli *P. aeruginosa* i *V. cycloides*. Przebieg frakcjonowania przedstawia schemat (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat frakcjonowania hodowli bakteryjnej
The scheme of fractionation of bacterial culture

Frację aminokwasową otrzymano też sposobem stosowanym przez Loefflera i Scherbeuma (15). Obecność związków zawierających grupy aminowe, amino-kwasy i peptydy niskocząsteczkowe w poszczególnych frakcjach wykrywano z pomocą roztworu ninhydryny w acetonie po uprzednim rozwinięciu chromatogramów w układach: fenol nasycony wodą oraz butanol—kwas octowy—woda w stosunku 4:1:5.

Węglowodany wykrywano testem anilinowym oraz amoniakalnym roztworem azotanu srebra, organiczne związki fosforowe — testem molibdenianowym po uprzednim sporządzeniu chromatogramu badanej frakcji, a zasady purynowe i pirymidynowe — na chromatogramach w świetle ultrafioletowym.

W badaniach posługiwano się również wyciągiem drożdżowym Difco, rozdzielonym na frakcje w ten sam sposób jak przesącze z hodowli bakterii.

WYNIKI

W pierwszej części pracy przebadano wpływ przesączy, uzyskanych z 23 szczepów bakterii, na ekscytację *A. castellanii*, *H. rhyodes* i 2 (B i D) nie oznaczonych szczepów ameb. Do doświadczeń użyto przesączy z 48-godzinnej hodowli bakterii na podłożu syntetycznym oraz na podłożu syntetycznym z dodatkiem 0,3% neopeptonu. Ponadto używano przesączy z hodowli bakterii grupy *coli-aerobacter* na pożywce syntetycznej, stosowanej przez Singha i współprac. (19), oraz przesączy z hodowli *Pseudomas* na pożywce syntetycznej, używanej przez Franka i Mossa (10). Wyniki tych doświadczeń (tab. 1) wskazują, że najsilniejszymi stymulatorami kiełkowania cyst

Tab. 1. Wpływ przesączy bakteryjnych na ekscystację ameb
The influence of bacterial culture filtrates on excystation of amoebae

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Sposób jałowienia przesączy Means of culture filtrate preparation	Procent ekscystacji Per cent of excystation														
		B				D				<i>H. rhyodes</i>				<i>A. castellanii</i>		
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c
<i>A. aerogenes</i> 25	filtracja	4		1		9		3		0		0		0		0
	60°C	4		1		12		0		2		0		0		0
	100°C	3		1		10		1		2		3		0		0
<i>A. aerogenes</i> 26	filtracja	8		0		4		2		0		0		0		3
	60°C	9		1		5		2		0		0		1		0
	100°C	7		2		3		2		0		0		0		0
<i>E. coli</i> 23	filtracja	22		0		3		7		1				0		
	60°C	0		0		2		8		2				2		
	100°C	1		2		6		6		4				0		

c.d. tab. 1 — table 1 continued

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Sposób jałowienia przesączy Means of culture filtrate preparation	Procent ekscystacji Per cent of excystation															
		B				D				H. rhyssodes				A. castellanii			
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	
<i>E. coli</i> 24	filtracja	68	92	45		96				92	96	76		3			
	60°C	54	92	56		93				88	98	69		4			
	100°C	12	94	8		71				62	91	42		5			
<i>P. vulgaris</i>	filtracja		45				37				8				0		
	60°C		43				20				7				0		
	100°C		40				34				9				0		
<i>Proteus Ox19</i>	filtracja		39				60				0				0		
	60°C		30				49				9				0		
	100°C		32				48				7				0		
<i>P. mirabilis</i>	filtracja		39				60				0				0		
	60°C		48				53				28				14		
	100°C		49				46				30				11		
<i>P. aeruginosa</i> 9	filtracja	34	70		43	54	40			46			40	0	9		
	60°C	77	70		49	59	39			60			79	0	6		
	100°C	98	82		55	75	39			69			94	0	4		
<i>P. aeruginosa</i> 10	filtracja	74			51	58				30	40				0		
	60°C	89			52	89				43	38				0		
	100°C	93			78	96				70	68				0		
<i>P. aeruginosa</i> 12	filtracja	49			29	46				20	42				11		
	60°C	84			64	82				46	58				14		
	100°C	92			63	94				72	72				9		
<i>S. marcescens</i>	filtracja		0			0					0				0		
	60°C		0			0					0				0		
	100°C		0			0					0				0		
<i>V. cyclospites</i>	filtracja	94	95			99				58	84			20	24		
	60°C	92	92			99				66	90			20	22		
	100°C	52	94			46				29	74			18	24		

c.d. tab. 1 — table 1 continued

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Sposób jałowienia przesączy Means of culture filtrate preparation	Procent ekscystacji Per cent of excystation							
		B		D		H. <i>rhysodes</i>		A. <i>castellani</i>	
		a	b	a	b	a	b	a	b
<i>S. aureus</i> 2	filtracja		0		0		0		0
	filtration		0		0		0		0
	60°C 100°C		0		0		0		0
<i>S. albus</i> 5	filtracja		5		0		8		0
	filtration		4		2		0		0
	60°C 100°C		0		0		0		0
<i>S. albus</i> 25	filtracja		7		11		2		0
	filtration		9		6		0		0
	60°C 100°C		2		4		0		0
<i>B. cereus</i> 26	filtracja		31		45		21		
	filtration		11		39		22		
	60°C 100°C		10		37		16		
<i>B. cereus v. thuringensis</i>	filtracja	56	0	70		59		9	
	filtration	52	0	51		30		0	
	60°C 100°C	23	0	33		28		0	
<i>B. subtilis</i>	filtracja		60		54		53		0
	filtration		59		60		54		0
	60°C 100°C		60		36		60		0
<i>B. megaterium</i>	filtracja		27				36		0
	filtration		79				29		0
	60°C 100°C		29				30		0
<i>Proactinomyces</i> sp.	filtracja	17		24		11		0	
	filtration	19		17		10		0	
	60°C 100°C	11		9		4		0	
<i>C. equi</i>	filtracja		0		0		0		0
	filtration		0		0		0		0
	60°C 100°C		0		0		0		0
Pałeczka glebowa nr 115	filtracja	28		34		8		18	
	filtration	18		15		12		9	
	60°C 100°C	12		8		13		0	
Pałeczka glebowa nr 96	filtracja	92	92	90	96	98	79	33	22
	filtration	93	92	91	93	94	82	27	0
	60°C 100°C	49	93	53	95	39	80	26	7

c.d. tab. 1 — table 1 continued

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Sposób jałowienia przesączy Means of culture filtrate preparation	Procent ekscystacji Per cent of excystation							
		B		D		H. rhysodes		A. castellanii	
		a	b	a	b	a	b	a	b
plyn fizjologiczny physiological saline		0		0		0		0	
pożywka syntetyczna synthetic medium		0		0		0		0	
pożywka syntetyczna z neopeptonem synthetic medium with neopeptone		0		0		0		0	

Objaśnienia: a — zmodyfikowana pożywka syntetyczna wg Kwapińskiego, b — zmodyfikowana pożywka syntetyczna wg Kwapińskiego z neopeptonem, c — pożywka syntetyczna wg Singha, d — pożywka syntetyczna wg Frank i Mossa.

Explanation: a — synthetic medium prepared according to Kwapiński, b — synthesis medium prepared according to Kwapiński with neopepton, c — synthetic medium prepared according to Singh, d — synthetic medium prepared according to Frank and Moss.

były przesące z hodowli *E. coli* szczepu 24, *P. aeruginosa* szczepów 9, 10 i 12, *V. cyclospites* i pałeczki glebowej nr 96. Również dodatni wpływ na kiełkowanie cyst wywierały przesące uzyskane z hodowli *P. vulgaris*, *Proteus O_x19*, *P. mirabilis*, *B. subtilis* i *B. megaterium* na podłożu syntetycznym z dodatkiem neopeptonu. Natomiast przesące uzyskane z hodowli szczepów *A. aerogenes* i *E. coli* na pożywce syntetycznej z dodatkiem neopeptonu oraz na pożywce opracowanej przez Singha i współprac. (19) prawie zupełnie nie pobudzały ekscystacji. Również przesące z hodowli *S. marcescens*, *S. aureus*, *S. albus*, *Proactinomyces* sp., *C. equi* i pałeczki glebowej nr 115 nie stymulowały tego procesu.

Najsilniejsze działanie pobudzające ekscystację wykazywały przesące jałowione przez świece Chamberlanda L5. Przesące ogrzewane przez 1 godz. w temp. 100°C wykazywały słabsze działanie, wyjątek stanowiły przesące otrzymane z hodowli *P. aeruginosa*. Ponieważ szczep ten produkował znaczne ilości pyocjaniny, sprawdzono, czy surowy ekstrakt tego pigmentu nie wywiera hamującego działania na ekscystację ameb. W tym celu sprawdzono kiełkowanie cyst szczepu B pod wpływem aktywnego stymulatora ekscystacji (ekstrakt alkoholowy z wyciągu z *A. aerogenes*) w obecności surowego ekstraktu pyocjaniny. Uzyskane wyniki (tab. 2) wskazują, że pyocjanina nie wywiera żadnego wpływu na ekscystację. Słabe kiełkowanie cyst pod wpływem przesączy z hodowli innych gatunków bakterii niepigmentotwórczych, ogrzewanych do temp. 100°C,

Tab. 2. Wpływ surowego ekstraktu pyocjaniny na kiełkowanie cyst ameb szczepu D
Effect of crude extract of pyocyanine on excystation of D strain of amoebae

Stymulator ekscystacji Stimulator of excystation	Procent wykiełkowanych cyst Per cent of excystment
Ekstrakt alkoholowy z wyciągu z <i>A. aerogenes</i> Fraction soluble in ethanol from desintegrated <i>A. aerogenes</i>	94
Ekstrakt alkoholowy z wyciągu z <i>A. aerogenes</i> + surowy ekstrakt pyocjaniny (1:1) Fraction soluble in ethanol from desintegrated <i>A. aerogenes</i> + crude extract of pyocyanine (1:1)	92
Ekstrakt alkoholowy z wyciągu z <i>A. aerogenes</i> + surowy ekstrakt pyocjaniny gotowany przez 2 godz. w temp. 100°C Fraction soluble in ethanol from desintegrated <i>A. aerogenes</i> + crude extract of pyocyanine heated at 100°C for 2 hr	92
Przesącz z hodowli <i>P. aeruginosa</i> ogrzany w temp. 100°C + surowy ekstrakt pyocjaniny (1:1) Culture filtrate of <i>P. aeruginosa</i> heated at 100°C + crude extract of pyocyanine (1:1)	74
Pyocjanina Pyocyanine	0

sugeruje, że w przesączach tych istnieje ciepłochwiejny aktywator procesu ekscystacji, który ulega zniszczeniu przez gotowanie.

Ponieważ najsilniejsze działanie stymulujące wywierały przesącze z hodowli *V. cycloides* i *P. aeruginosa*, w dalszej części pracy przebadano ich wpływ na kiełkowanie form przetrwalnych 45 szczepów ameb (fot. 1—12).

Badając wpływ przesączy *V. cycloides* i *P. aeruginosa* na ekscystację (tab. 3) stwierdzono, że cysty 7 szczepów ameb przechodziły w formy troficzne w środowisku pozbawionym zupełnie substancji organicznej (płyn fizjologiczny, pożywka syntetyczna). Cysty 32 szczepów kiełkowały w dużym procencie pod wpływem przesączy z hodowli *V. cycloides* i *P. aeruginosa*, tylko cysty 6 szczepów potrzebowały do kiełkowania obecności żywych komórek *A. aerogenes*.

W celu znalezienia związków chemicznych, które stymulują ekscystację form przetrwalnych ameb przeprowadzono frakcjonowanie przesączy. Podczas obserwacji działania poszczególnych frakcji przesącza hodowli *P. aeruginosa* na kiełkowanie kilku wybranych szczepów ameb stwier-

Wpływ filtratu hodowli bakteryjnych na ekscystację małych gleb...

Tab. 3. Wpływ wyciągu bakterii, przesączy z hodowli bakterii oraz wyciągu drożdżowego na ekscystację ameb

The influence of bacterial culture filtrates and of yeast extract on excystation

Szczepy Strains	Stymulator procesu ekscystacji Stimulator of excystation						Płyn fizjo- logiczny Physiolo- gical saline
	Przesącz z hodowli <i>V. cyclo-</i> <i>sites</i> Culture filtrate of <i>V. cyclo-</i> <i>sites</i>	Przesącz z hodowli <i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i> Culture filtrate of <i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i>	Ekstrakt alkoholowy z wy- ciągu drożdżowego Difco Fraction of yeast extract soluble in ethanol			Pożywka synte- tyczna Synthetic medium	
			a	b	c		
	Procent cyst wykieikowanych Per cent of excystment						
W1	0	0	0	0	0	0	0
W2	84	60	89	46	90	0	0
W3	70	32	78	39	15	0	0
W4	72	37	99	98	98	68	58
W5	22	71	96	53	91	0	0
W6	40	39	72	71	74	0	0
W9	0	0	33	—	—	0	0
W10	96	89	90	85	91	89	72
W12	—	28	31	—	—	0	0
W13	0	0	39	36	43	0	0
W15	—	25	36	—	—	0	0
W16	86	92	85	58	62	0	0
W17	57	93	95	94	92	39	41
W18	78	86	91	37	84	59	63
W19	0	0	0	0	0	0	0
W22	51	33	96	72	36	0	0
W23	28	32	98	98	98	3	5
W24	0	56	97	82	90	0	0
AA	—	71	99	62	77	0	0
C	—	16	49	22	49	0	0
E	—	62	95	80	76	0	0
X	66	59	84	76	85	0	0
G1	83	86	96	84	92	0	0
G3	—	46	84	29	86	48	47
G6	59	37	79	36	52	26	19
G7	32	46	42	38	40	0	0
G8	—	39	89	53	92	7	6
G10	0	0	0	0	00	0	0
G11	85	62	98	70	98	0	0
G13	22	27	32	12	43	0	0
G14	34	39	50	40	61	0	0
G16	39	36	76	72	68	0	0
G17	50	85	65	57	69	0	0
G18	58	89	90	88	90	0	0
G19	0	0	0	0	0	00	0
G20	27	0	69	—	—	0	0
G21	22	16	30	22	20	0	0
G22	70	66	87	50	70	6	4
G23	18	31	74	52	66	0	0
B	94	92	96	96	95	0	0
<i>A. castellanii</i>	20	—	79	—	—	0	0
<i>H. rhyodes</i>	58	66	68	12	79	0	0
<i>S. russelli</i>	—	43	78	92	78	0	0
<i>D. thorntoni</i>	excyst	excyst	excyst	excyst	excyst	excyst	excyst

Objaśnienia: a — pełny ekstrakt, b — frakcja aminokwasowa, c — frakcja „obojętna”.

Explanation: a — alcohol extract, b — fraction of amino acids, c — “neutral” fraction.

Tab. 4. Wpływ poszczególnych frakcji przesączu z hodowli *P. aeruginosa* na ekscystację

The influence of fractions of *P. aeruginosa* culture filtrate on excystation

Nazwa frakcji Fraction		Procent wykiełkowanych cyst Per cent of excystment			
		B	D	<i>H.</i> <i>rhyssodes</i>	<i>Sch.</i> <i>russelli</i>
Przesącz jałowiony przez sączenie przez świe- ce Chamberlanda L5 Culture sterilized by filtration through Cham- berland L5		72	89	66	33
Ekstrakt alkoholowy z przesączu Ethanol extract from culture filtrate		79		66.8	
Osad z przesączu po ekstrakcji alkoholowej Sediment after ethanol extraction		9	7	0	
Frakcja aminokwasowa Fraction of aminoacids		12	18	0	21
Frakcja „obojętna” "Neutral" fraction		76	68	70	54
Frakcja kwasów organicznych Fraction of organic acids		0	0	0	0
Kontrola Control	płyn fizjologiczny physiological saline	0	0	0	0
	pożywka syntetyczna synthetic medium	0	0	0	0

dzono, że czynnik warunkujący ekscystację zawarty jest we frakcji rozpuszczalnej w 80% etanolu (tab. 4). Frakcję tę rozdzielono przy pomocy wymienników jonowych, uzyskując 3 dalsze frakcje: a) złożoną z aminokwasów, które występowały w przesączach bakteryjnych w bardzo małych ilościach, b) zawierającą kwasy organiczne oraz c) „obojętną”, która nie absorbowwała się na wymiennikach jonowych. Frakcja ta zawierała niskocząsteczkowe peptydy, substancje redukujące, głównie glukozę, oraz nieznaczne ilości fosforanów organicznych. Spośród tych trzech frakcji stymulująco na kiełkowanie cyst szczepów B, D i *S. russelli* wpływała frakcja aminokwasowa. Najsilniejsze działanie wykazywała jednak frakcja „obojętna”, pobudzając do ekscystacji największy procent cyst (tab. 4).

DISKUSJA

Badania nad ekscystacją form przetrwalnych pierwotniaków były podejmowane przez Wolffa (22, 23), Barkera i Taylora (2),

Letice Crump (6), dopiero jednak prace Singha (9, 18, 19, 20), Beersa (3), Bakerspiegela (1), Barbary Dudziak (8, 9), Drożańskiego (7), Kunickiego-Goldfingera i współprac. (12) oraz Butzela i Horwitza (5) wykazały, że obok wielu czynników środowiskowych bakterie odgrywają zasadniczą rolę w procesie kiełkowania form przetrwalnych niektórych gatunków pierwotniaków.

Zależność ekscystacji ameb od obecności bakterii w ich środowisku była stwierdzona przez Crump (6), która, badając wpływ czynników zewnętrznych na kiełkowanie dwóch nie oznaczonych szczepów ameb, stwierdziła, że formy przetrwalne jednej z nich nie kiełkowały, jeśli brak było w środowisku bakterii. Autorka ta nie obserwowała kiełkowania cyst zarówno w płynie fizjologicznym, jak i w pożywce, na której uprzednio namnażała bakterie. W oparciu o te spostrzeżenia Crump wnioskuje, że bakterie produkują substancje indukujące ekscystację pełzaków. Według tej autorki substancje te bardzo szybko ulegają inaktywacji.

Do podobnych wniosków doszedł Bakerspiegel (1), stwierdzając, że badana przez niego ameba kiełkuje tylko w obecności żywych, namnażających się bakterii.

Singh i współprac. (18, 19) używali cyst ameby stosowanej do badań przez Crump i oznaczonej przez Singha jako *S. russelli*. Wykazali oni, że cysty *S. russelli* kiełkują nie tylko w obecności bakterii, ale również pod wpływem produktów dyfundujących przez błonę półprzepuszczalną. Wyniki te zostały potwierdzone przez Kunickiego-Goldfingera i współprac. (19) w badaniach nad amebami wolnożyjącymi wyosobnionymi z gleby. Singh i współprac. (21) wykazali, że kiełkowanie cyst *S. russelli* powodują substancje ciepłostale, głównie aminokwasy uzyskane przez ekstrakcję bakterii.

Podjmując badania starano się wyjaśnić, czy zależność procesu ekscystacji ameb od obecności bakterii oraz ich metabolitów jest zjawiskiem powszechnym. Uzyskane wyniki (tab. 4) wskazują, że na 45 przebadanych szczepów ameb u 39 ekscystacja jest uzależniona od obecności w środowisku bakterii oraz ich produktów. Nie wszystkie jednak bakterie wytwarzały metabolity stymulujące ekscystację (tab. 2). Nie jest wykluczone, że odgrywał w tym przypadku rolę skład pożywki, na której namnażano bakterie oraz wydzielane przez niektóre bakterie produkty metabolizmu, działające szkodliwie na ekscytację.

Potwierdzone zostały również wyniki uzyskane przez Singha i współprac. (19) w badaniach nad *S. russelli*. Wykazano bowiem, że formy przetrwalne 45 szczepów ameb mogą kiełkować pod wpływem czynników ciepłostalnych, uzyskanych przez ekstrakcję komórek bakteryjnych albo pod wpływem przesączy z ich hodowli. Nie wszystkie jednak formy przetrwalne ekscystują pod wpływem tych samych związków organicz-

nych. Stwierdzono, że formy przetrwalne ameb B i D kiełkują zarówno w obecności frakcji aminokwasowej, jak i frakcji „obojętnej”, podczas gdy cysty *H. rhysodes* kiełkują tylko w obecności frakcji „obojętnej”. Wyniki te wskazują, że ekscystacja poszczególnych gatunków, a nawet szczepów ameb, wymaga swoistych stymulatorów tego procesu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bakerspiegel A.: Observation on the Culture and Maintenance of Free-living *Amoeba*. Can. J. Microbiol., 2, 511 (1956).
2. Barker H. A., Taylor C. V.: Studies on the Excystment of *Colpoda cucullus*. Physiol. Zool., 6, 127 (1933).
3. Beers C. D.: The Excystment in *Didinium nasutum* with Special Reference to the Role of Bacteria. J. Expr. Zool., 103, 201 (1946).
4. Bejerink M.: Kulturversuche mit Amoeben auf festen Substrate. Zentr. Bakteriol. Protistenk., 19, 257 (1896).
5. Butzel H. M., Horwitz H.: Excystment of *Didinium nasutum*. J. Protozool., 12, 413 (1965).
6. Crump L. M.: The Influence of Bacterial Environment on the Excystment of *Amoebae* from Soil. J. gen. Microbiol., 4, 16 (1950).
7. Drożański W.: The Influence of Bacteria on the Excystment of Soil *Amoebae*. Acta Microbiol. Polon., 10, 147 (1961).
8. Dudziak B.: Kiełkowanie i wzrost ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego. Acta Microbiol. Polon., 4, 115 (1955).
9. Dudziak B.: Wpływ prątków kwasoopornych na pelzaki glebowe. Acta Microbiol. Polon., 11, 223 (1962).
10. Frank L. H., Moss R. D.: On the Biosynthesis of Pyocyanine. J. Bact., 77, 776 (1959).
11. Harrison D. W.: A Technique for Obtaining Clone Cultures of Soil *Amoebae* in Sterile Liquid Medium. Nature, 180, 1301 (1957).
12. Kunicki-Goldfinger W. i współprac.: Bakterie jako pokarm pelzaków. Acta Microbiol. Polon., 6, 331 (1957).
13. Kwapiński J.: Immunologiczna analiza drobnoustrojów. Post. Hig. i Med. Dośw., 4, 433 (1959).
14. Lamy L., Molinary V.: Etude experimental de l'activite de substances antibiotiques sur *Entamoeba histolytica* en culture dans ses rapports avec la flora bacterienne associate. Ann. Inst. Pasteur., 94, 655 (1958).
15. Loefer J. B., Scherbaum O. H.: Amino Acid Composition of Protozoa. Comparative Studies on *Tetrahymena*. J. Protozool., 8, 184 (1961).
16. Mouton H.: Recherches sur la digestion chez les amibes et sur leur diastase intracellulaire. Ann. Inst. Pasteur., 16, 475 (1902).
17. Neff R. J.: Mechanisms of Purifying *Amoebae* by Migration on Agar Surfaces. J. Protozool., 5, 226 (1958).
18. Singh B. M., Mathews S., Srenivasaya M.: Occurrence and Nature of *Amoebae* Excystment Factor Produced by *Aerobacter* sp., Nature, 177, 621 (1956).
19. Singh B. N., Mathews S., Anand N.: The Role of *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* and Certain Amino Acids in the Excystment of *Schizopyrenus russelli*, J. gen. Microbiol., 19, 104 (1958).

20. Singh B. N., Saxena U., Iyer S. S.: Production of Viable Sterile Cysts of Free-living *Amoebae*. Role of Bacteria on Excystment. J. exp. Biol., 110, 112 (1964).
21. Tsujitani J.: Über die Reinculture der Amöben. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. 1, 24, 66 (1898).
22. Wolff E.: Un facteur de l'enkystment des Amibes d'eau douce. Prolongation experimentale de la période végétative. C. R. Soc. Biol., 98, 636, 1927.
23. Wolff E.: Le déterminisme de l'enkystment des Amibes d'eau douce. Rôle des variations de la pression osmotique. C. R. Soc. Biol., 96, 989, 1927.

OPIS FOTOGRAFII

Fot. 1—9. Cysty wybranych szczepów ameb wyizolowanych z gleby i zbiorników wodnych:

Fot. 1. szczep B

Fot. 2. szczep D

Fot. 3. szczep G 10

Fot. 4. szczep G 18

Fot. 5. szczep G 22

Fot. 6. szczep W 2

Fot. 7. szczep W 10

Fot. 8. *Didasculus thornthoni*

Fot. 9. *Schizopyrenus russelli*

Fot. 10 i 11. Kolejne stadia kielkowania cyst *H. rhyodes*

Fot. 12. Osłony cyst szczepu W 2 i G 10 po excystacji.

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние фильтратов 23 штаммов бактерий на эксцистацию *Acanthamoeba castellanii* и *Hartmannella rhyodes*, а также на эксцистацию двух неопределенных почвенных амев. Самая сильная стимуляция эксцистации получена под влиянием фильтрата культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Vibrio cycloclites*. Стерилизованные через бактериологические фильтры фильтраты были активнее по сравнению с фильтратами стерилизованными при температуре +60°C и +100°C.

Исследовали влияние фильтратов культур *V. cycloclites* и *P. aeruginosa* на эксцистацию 45 штаммов амев. Определено, что цисты 32 штаммов амев эксцистировали под влиянием этих фильтратов. Цисты 7 штаммов амев не требовали для эксцистации присутствия никакого стимулятора, зато цисты 6 штаммов амев прорастали только в присутствии живых бактерий.

Провели разделение фильтратов культур *P. aeruginosa* и *V. cycloclites* на фракции. Доказано, что активный фактор в процессе эксцистации содержится в аминокислотной фракции и в, так называемой, „нейтральной” фракции.

SUMMARY

The influence of the filtrates of 23 bacterial strains on excystment of *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmanella rhyodes* and two not classified strains of small free-living amoebae was tested. It was shown that culture filtrates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cyclospites* were most active. The culture filtrates sterilized by filtration induced the excystment more effectively than those sterilized by heating.

Studies on the influence of culture filtrates of *P. aeruginosa* and *V. cyclospites* on the excystation of 45 strains of amoebae isolated from soil and fresh water reservoirs were also carried out. It was shown that culture filtrates of these two bacteria stimulated the excystation of 32 strains of amoebae. The cysts of 7 strains of amoebae excysted readily in water or in the synthetic media without bacteria while the cysts of 6 strains of amoebae excysted very rarely unless living bacteria were present.

Fractionation of *P. aeruginosa* culture filtrates was carried out. It was shown that the factors active in excystment were present in the fraction of amino-acids as well as in the "neutral" fraction.

EXPLANATION TO PHOTOS

Photos 1—9. Cysts of selected strains of amoebae isolated from soil and fresh water reservoirs:

Photo 1. strain B

Photo 2. strain D

Photo 3. strain G 10

Photo 4. strain G 18

Photo 5. strain G 22

Photo 6. strain W 2

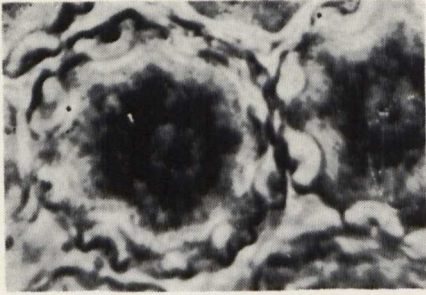
Photo 7. strain W 10

Photo 8. *Didasculus thorntoni*

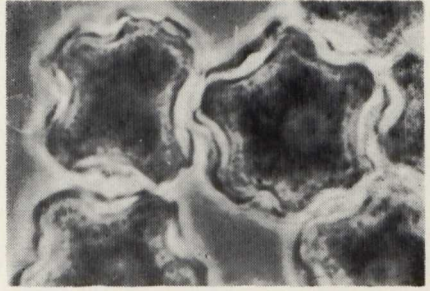
Photo 9. *Schizopyrenus russelli*

Photos 10 and 11. Successive stages of excystment of *H. rhyodes*

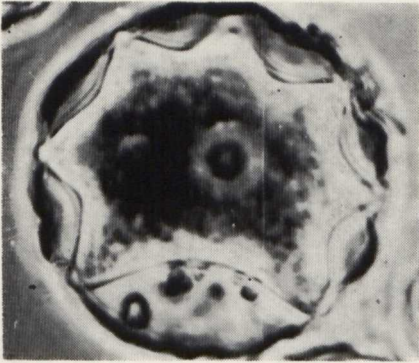
Photo 12. Empty cysts of strains W 2 and G 20 after excystment.



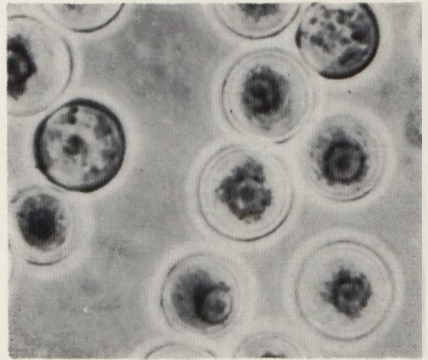
Fot. 1



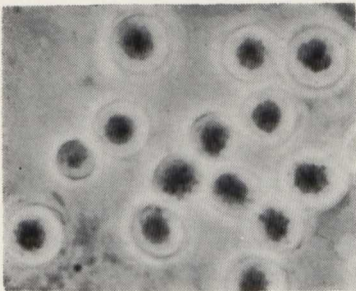
Fot. 2



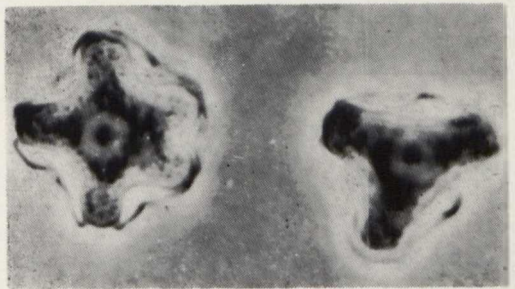
Fot. 3



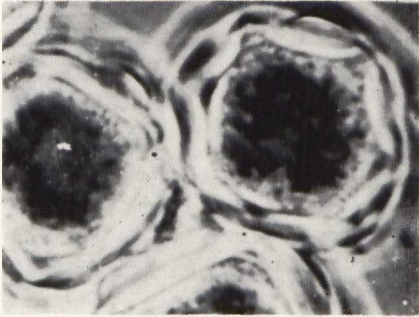
Fot. 4



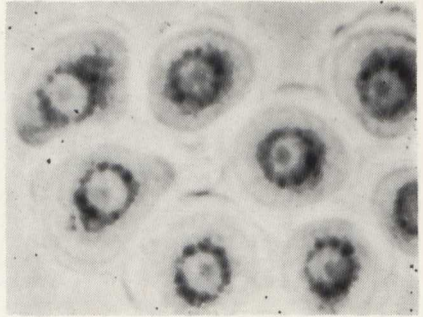
Fot. 5



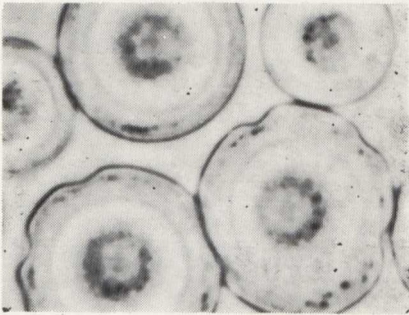
Fot. 6



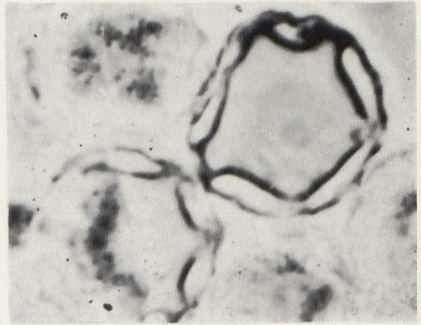
Fot. 7



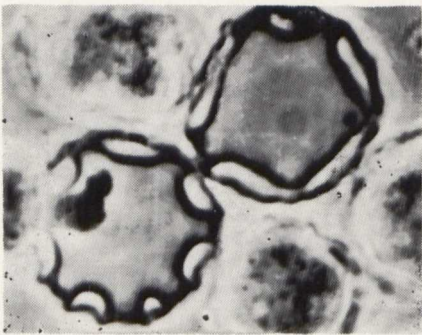
Fot. 8



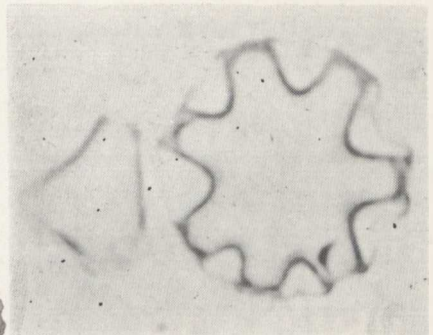
Fot. 9



Fot. 10



Fot. 11



Fot. 12