

Z Katedry Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS  
Kierownik: prof. dr Zbigniew Lorkiewicz

Wincenty DROŻAŃSKI

### Kinetyka ekscystacji ameb wolnożyjących

Кинетика эксцистации амёб, изолированных из естественных условий

Kinetics of the Excystment of Free-living Amoebae

#### WSTĘP

Ekscystacja form przetrwalnych pierwotniaków jest procesem złożonym. Według Wagtendonka (7) polega ona na odtworzeniu struktur cytoplazmatycznych, wewnętrznej reorganizacji oraz na wydostaniu się formy troficzej z osłony. Ekscystację form przetrwalnych indukują bakterie, głównie określone związki chemiczne przez nie produkowane (1, 2, 4, 5, 6). Mechanizm aktywacji form przetrwalnych przez stymulatory ekscystacji nie został dotąd wyjaśniony. Brak również danych do określenia najkrótszego czasu kontaktu cyst ze stymulatorem, potrzebnego do pobudzenia ekscystacji.

Celem pracy było określenie czasu kontaktu form przetrwalnych ameb oraz zbadanie wpływu temperatury na ten proces.

#### MATERIAL I METODY

Przygotowanie cyst pozbawionych bakterii. Do badań użyto cyst *Hartmannella rhyodes* oraz ameb glebowych szczepu B. Ameby hodowano na agarze nieodżywczym w obecności gęstej zawiesiny żywych komórek *A. aerogenes*. Cysty, zebrane z 7—10-dniowej monoksenicznej hodowli, kilkakrotnie wirowano przy 100—200 g, przemywając je za każdym razem jałowym płynem fizjologicznym. Pozostałe bakterie niszczone przy pomocy antybiotyków (3) oraz 2% kwasem solnym (6). W celu zlizowania zabitych bakterii do zawiesiny cyst dodawano 2% desoksycholanu sodu. Gęstą zawiesinę cyst po kilkakrotnym przepłukaniu jałową wodą destylowaną przechowywano w temp. 4°C. Oczyszczone formy przetrwalne nie traciły aktywności biologicznej przez okres ok. 10 dni.

Przygotowanie stymulatora procesu ekscystacji. Jako stymulatora procesu ekscystacji używano wyciągu wodnego z *A. aerogenes*. Dwudziestoczerogodzinną hodowlę *A. aerogenes* na agarze odżywcym przemywano płynem fizjologicznym. Uzyskaną masę bakterii dezintegrowano przez wielokrotne zamrażanie do  $-78^{\circ}\text{C}$  i odmrażanie. Po rozbiciu ok. 60—70% komórek bakterie gotowano przez 1 godz., a następnie wirowano przy 6000 obr./min. przez 30 min. Uzyskany płyn z nad osadu ekstrahowano etanolem; końcowe stężenie etanolu wynosiło 80%. Frakcję rozpuszczalną w alkoholu oddzielano od rozpuszczalnika przez odparowanie. Otrzymany osad rozpuszczano w wodzie destylowanej i 3-krotnie jałowiono w temp.  $100^{\circ}\text{C}$ . Stężenie substancji stymulującej ekscystację odpowiadało zawartości 1% alaniny oznaczonej ninhydryną. Jako stymulatora ekscystacji używano też frakcji rozpuszczalnej w alkoholu z wyciągu drożdżowego Difco. Końcowe stężenie substancji stymulującej w wyciągu alkoholowym odpowiadało ilości tej substancji zawartej w 1% wyciągu drożdżowym Difco.

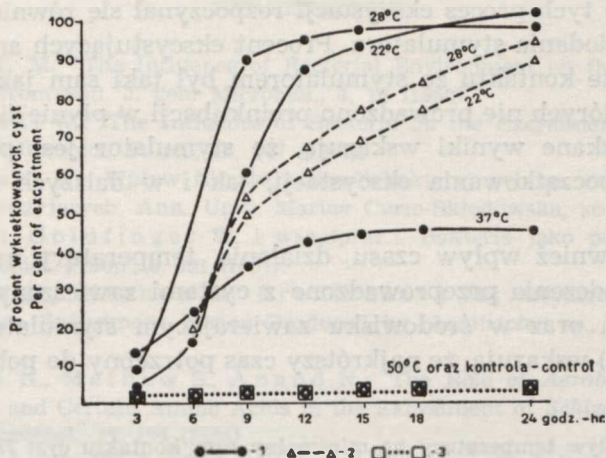
Badania kinetyki ekscystacji. Pozbawioną bakterii zawieszoną cyst o gęstości ok.  $4 \times 10^5$  w ml rozlewano po 0,1 ml do jałowych probówek, dodając 0,4 ml ekstraktu alkoholowego z *A. aerogenes* lub z wyciągu drożdżowego Difco. W doświadczeniach, w których badano najkrótszy czas kontaktu cyst ze stymulatorem, jaki jest potrzebny do wywołania ekscystacji u największej ilości form przetrwalnych, cysty po określonym czasie kontaktu odplukiwano od substancji stymulującej przez 3-krotne wirowanie i przemywanie wodą destylowaną. Łączny czas inkubacji wynosił 12 godz. Liczbę ameb ekscystujących podano w procentach, obliczając stosunek cyst pełnych do pustych.

W podobny sposób przeprowadzono doświadczenia nad wpływem temperatury na czas kontaktu cyst ze stymulatorem. Poszczególne próbki wstawiano na określony czas do łaźni wodnej w temp. 22, 28, 37 i  $50^{\circ}\text{C}$ . Po odplukaniu od stymulatora cysty pozostawiano w temp.  $22^{\circ}\text{C}$  na czas potrzebny do dopełnienia do 12 godz.

#### WYNIKI I DISKUSJA

Cysty *H. rhysodes* i szczepu B pobudzano do ekscystacji w różnych temperaturach, stosując jako stymulatory ekstrakty alkoholowe z wyciągu drożdżowego Difco oraz z komórek *A. aerogenes*. Zawierały one zarówno frakcję aminokwasową, jak i frakcję „obojętną” (3). Wykazano, że optymalna dla ekscystacji obu szczepów ameb była temp.  $28^{\circ}\text{C}$ , temp.  $37^{\circ}\text{C}$  hamowała całkowicie ekscystację *H. rhysodes* oraz wyraźnie obniżała procent ekscystacji szczepu B, natomiast w temp.  $22^{\circ}\text{C}$  ameby ekscystowały w wysokim procencie, jednak proces ten przebiegał wolniej niż w temp.  $28^{\circ}\text{C}$  (ryc. 1).

Poza tym stwierdzono, że proces ekscystacji jest wyraźnie zależny od obecności stymulatora. W seriach kontrolnych cysty zawieszono tylko w płynie fizjologicznym nie ekscystowały. W dalszych doświadczeniach starano się wykazać, czy aktywne ekstrakty *A. aerogenes* oraz z wyciągu drożdżowego są potrzebne tylko do zapoczątkowania ekscystacji, czy też obecność ich jest niezbędna przez cały okres wewnętrznej reorganizacji pełzaka, aż do momentu migracji z osłon okrywających. Wyniki doświadczeń (tab. 1) przemawiają za tym, że proces ekscystacji wymaga stałej



Ryc. 1. Wpływ temperatury na ekscystację ameb: 1 — szczep B, 2 — *H. rhyssodes*, 3 — kontrola

The influence of temperature on excystment of amoebae: 1 — strain B, 2 — *H. rhyssodes*, 3 — control

Tab. 1. Wpływ czasu kontaktu cyst ameb szczepu B i *H. rhyssodes* ze stymulatorem na ekscystację

The influence of the time of contact of strain B and *H. rhyssodes* cysts with the stimulator on the velocity of excystment

Czas kontaktu w godz. Time of contact in hr	Procent cyst wykietkowanych po 12 godz. inkubacji w temp. 22° Per cent of excystation after 12 hr of incubation at 22°	
	szczep B strain B	<i>H. rhyssodes</i>
1/2	0	0
1	2	0
2	11	8
4	29	19
6	52	48
9	76	72
12	89	86
Kontrola — płyn fizjologiczny Control — physiological saline	4	0

obecności stymulatora. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki doświadczeń, w których przed dodaniem stymulatora cysty zawieszono w płynie fizjologicznym inkubowano przez 6 godz. w temp. 28°C. W do-

świadczeniach tych proces ekscystacji rozpoczynał się również po 4 godz od momentu dodania stymulatora. Procent ekscystujących ameb po odpowiednim czasie kontaktu ze stymulatorem był taki sam jak w doświadczeniach, w których nie prowadzono preinkubacji w płynie fizjologicznym (tab. 1). Uzyskane wyniki wskazują, że stymulator jest potrzebny zarówno do zapoczątkowania ekscystacji, jak i w dalszych etapach tego procesu.

Badano również wpływ czasu działania temperatury na ekscystację ameb. Doświadczenia przeprowadzono z cystami zawieszonymi w płynie fizjologicznym oraz w środowisku zawierającym stymulator. Uzyskane wyniki (tab. 2) wskazują, że najkrótszy czas potrzebny do pobudzenia cyst

Tab. 2. Wpływ temperatury na minimalny czas kontaktu cyst *H. rhysodes* ze stymulatorem procesu ekscystacji

The influence of the temperature on the time of contact of *H. rhysodes* cysts with the stimulator of excystment

Czas działania w godz. Time of action in hr	Procent cyst wykiełkowanych po 12 godz. inkubacji w temp.: Per cent of excystment after 12 hr of incubation at:			
	22°C	28°C	37°C	50°C
1	0	0	0	0
2	8	2	18	0
4	22	37	45	0
6	31	52	64	0
9	79	87	48	0
12	93	91	37	0
Kontrola — płyn fizjologiczny Control — physiological saline	0	0	0	0

do ekscystacji wynosi 4 godz. Największy procent ekscystujących ameb uzyskano po czasie 9—12 godz. w temp. 28°C. Temperatura 50°C całkowicie hamuje ten proces, natomiast w temp. 37°C obserwuje się charakterystyczny jego przebieg, a mianowicie — aktywacja cyst pod wpływem stymulatora przebiega początkowo najszybciej, jednak po dłuższym czasie następuje uszkodzenie młodych form troficznych.

Z dodatkowych doświadczeń wynika, że cysty ameb są mało odporne na działanie temperatury. Cysty trzymane przez 1 godz. w temp. 55°C, przez 15 min. w temp. 60°C oraz przez 2 min. w temp. 80°C traciły całkowicie zdolność do ekscystacji.

## PIŚMIENNICTWO

1. Crump L. M.: The Influence of Bacterial Environment on the Excystment of *Amoebae* from Soil. J. gen. Microbiol., 4, 16 (1950).
2. Drożański W.: The Influence of Bacteria on the Excystment of Soil *Amoebae*. Acta Microbiol. Polon., 10, 147 (1961).
3. Drożański W.: Wpływ filtratu hodowli bakteryjnych na ekscystację małych ameb wolnożyjących. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 25 (1970).
4. Kunicki-Goldfinger W. i współprac.: Bakterie jako pokarm pełzaków. Acta Microbiol. Polon., 6, 331 (1957).
5. Singh B. N., Mathew S., Srenivasaya M.: Occurrence and Nature of *Amoebae* Excystment Factor Produced by *Aerobacter sp.*, Nature, 177, 621 (1956).
6. Singh B. N., Mathew 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).
7. Wagtendonk W. J.: Encystment and Excystment of Protozoa [w:] Hutter S. H., Lwoff A: Biochemistry and Physiology of Protozoa., Academic Press Inc., New York 1955.

## РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние температуры и времени контакта цист *Hartmannella rhyodes* и штамма В со стимулятором на протекание эксцистации.

В качестве стимулятора эксцистации использовали спиртовой экстракт из *Aerobacter aerogenes* и дрожжевой экстракт Difco.

Констатировали, что стимулятор эксцистации является необходимым как для начального, так и для позднего этапов прорастания.

## SUMMARY

The influence of the temperature and time of contact of *Hartmannella rhyodes* and strain B cysts with stimulator on excystment was studied.

Ethanol fractions both from water-soluble extract of *Aerobacter aerogenes* and from Difco yeast extract were used as stimulators of excystment.

It was shown that the stimulators are involved not only in the initiation of excystment but also in further steps of excystation.

