

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN - POLONIA

VOL. VIII, 3.

SECTIO C

15 XII.52

Z Zakładu Zoologii i Parazytologii Wydziału Weterynaryjnego U. M. C. S.
Kierownik: prof. dr Zdzisław Raabe

Z Zakładu Zoologii Systematycznej Instytutu Zoologicznego Uniwersytetu Warszawskiego
Kierownik: prof. dr Tadeusz Jaczewski.

Marek DOROSZEWSKI

**Z badań nad działaniem fitoncydów cebuli
na *Paramecium caudatum* Ehrb.**

**К вопросу о действии фитонцидов лука
на *Paramecium caudatum* Ehrb.**

**A Study on the action of the phytoncides of onion
on *Paramecium caudatum* Ehrb.**

Zagadnienie fitoncydów (Tokin) jest obecnie szeroko dyskutowane w świecie naukowym. Jego wielkie znaczenie teoretyczne i praktyczne nie ulega żadnej wątpliwości. Prowadzone są rozległe badania nad składem chemicznym i występowaniem fitoncydów w przyrodzie, jednak sprawa mechanizmu ich działania na organizm żywy pozostaje w dalszym ciągu niejasna.

Bardzo ważna jest kwestia doboru odpowiedniego materiału do tych badań. Do badań nad działaniem substancji trujących są często używane (np. przy pracach farmaceutycznych — Jirovec) pierwotniaki jako pewnego rodzaju odczynniki biologiczne. Zalety ich stosowania są jasne nawet przy najbardziej powierzchownych badaniach, tj. takich, w których chodzi tylko o stwierdzenie toksyczności badanych substancji. Ma się bowiem możliwość dysponowania dużą liczbą osobników, które łatwo jest otrzymać w krótkim czasie i które można jednocześnie obserwować. Jednak zalety pierwotniaków jako materiału do badań w jeszcze większym stopniu uwidoczniają się w pracach, mających na celu głębsze wniknięcie w mechanizm działania czynników toksycznych. Możemy tu bowiem obserwować zmiany w całym organizmie jednocześnie, mając go w całości w polu widzenia, nie potrzebując sztucznie wyodrębnić z organizmu składowych elementów w czasie badania. Tak więc możliwość śledzenia zmian w całym organizmie-komórce stanowi o lepszej przydatności pierwotniaków do tych badań niż *Metazoa*. Do pewnego stopnia można się też spodziewać mniejszej złożoności elementarnych procesów życiowych u pierwotniaków w porównaniu z *Metazoa*. W dążeniu do docierania do zjawisk coraz prostszych należałoby sięgnąć aż do bakterii czy wirusów, jednak chcąc otrzymać wnioski dotyczące komórek zwierzęcych (choć wybitnie wyspecjalizowanych) można

się zatrzymać na pierwotniakach. Dochodzi tu możliwość obserwowania zachowania się organelli komórkowych o dużym zróżnicowaniu morfotycznym. Pierwotniaki są wdzięcznym materiałem do badań nad fitoncydami i odwrotnie fitoncydy, a szczególnie ich lotne frakcje, są dobrym środkiem do badań nad pierwotniakami. Przy użyciu lotnych frakcji substancje, którymi się zadziało, nie wpływają (lub wpływają w minimalnym stopniu) na użyte następnie odczyniki.

Najważniejsze prace dotyczące działania fitoncydów na *Paramecium caudatum* Ehrb. wykonała A. Kovalenok. Przytaczam tu jej wyniki. Po zadziaaniu fitoncydami na *P. caudatum* Ehrb. wykazuje ono najpierw wzmożony ruch. Po minucie¹⁾ ruchy zaczynają się zwalniać i w trzeciej lub czwartej minucie wszystkie wymoczki giną. Przedni koniec ciała staje się ostro zakończony, podczas gdy tylny zaokrąglą się, plazma zaczyna wykazywać strukturę ziarnistą, macronucleus staje się wyraźnie widoczny. Po kilku minutach (3—10), czasem bezpośrednio po ustaniu ruchu powierzchnia ciała pokrywa się licznymi pęcherzykami. Zawartość pęcherzyków jest zupełnie jednorodna²⁾.

Autorka wypowiada opinię, że gdyby zawartość pęcherzyków pochodziła z wypróżnienia wodniczki tętniącej, to wtedy pęcherzyki powinny być mniejsze, gdy tymczasem w rzeczywistości ich objętość przekracza objętość ciała wymoczka. Dziwi ją także fakt jednorodności struktury pęcherzyków. Gdyby zachodziło podniesienie pellikuli w pewnym punkcie ciała i wypłynięcie zawartości wodniczki tętniącej, to nie mogłyby dostać się do pęcherzyka sąsiednie części cytoplazmy mające strukturę ziarnistą. Może zachodzić energetyczna reakcja między parą fitoncydową i powierzchniowymi warstwami cytoplazmy. Tak samo możliwe, że półprzepuszczalna pellikula może być zdolna do zmieniania fitoncydów. Wtenczas formowanie się pęcherzy można by odnieść do zjawisk natury plazmolitycznej.

Zjawisk paranevrozy autorka nie obserwowała.

U *Spirostomum teres* Cl. et L. Kovalenok stwierdza wczesne zatrzymywanie się wodniczki tętniącej pod wpływem fitoncydów.

B. Tokin wypowiada pogląd co do tworzenia się pęcherzy, że być może pellikula *Paramecium* składa się z kilku warstw, przy czym

1) Autorka nie podaje stosowanej tu przez siebie metody dozowania fitoncydów.

2) Według badań B. Tokina i A. Kovalenok, pęcherze mogą powstawać pod wpływem fitoncydów w każdym miejscu ciała wymoczka, chociaż cytowane przez Tokina prace C. Childa nad *Paramecium* dowodzą, że pod działaniem innych czynników szkodliwych zmiany morfologiczne zaczynają się rozchodzić z przedniego końca ciała.

oddziela się warstwa powierzchniowa. Wysuwa on też hipotezę, że tworzenie się pęcherzy może być procesem defektywnej incystacji. Tokin traktuje to jednak jako przypuszczenia nie oparte na doświadczeniach. W każdym razie staje się jasne, że kwestia zachowania się pelikuli wymaga dokładniejszego zbadania eksperymentalnego.

Na pierwszy plan wysuwa się tutaj konieczność opracowania zmian zachodzących w układach srebrochlonych. Sprawa ta staje się aktualna jeszcze z innego względu — mianowicie B. Klein (str. 40 i 41) w swojej pracy stwierdza co następuje: „na szkodliwe oddziaływanie (tak samo jak i na normalne) reaguje ze wszystkich części składowych komórek najpierw zawsze układ srebrochlony, tj. gdy plazma i jądro nie wykazują jeszcze żadnych zmian, to zmiany te już zachodzą w układzie srebrochlonym jako naruszenie stanu formy czy struktury i często dochodzą do całkowitego zniszczenia systemu. System srebrochlony przez ujawnienie dostrzegalnych zmian jest w ten sposób najczulszym wskaźnikiem najrozmaitszych oddziaływań“.

Klein przebadał działanie wielu substancji nieorganicznych i organicznych i na ich podstawie stworzył pewną klasyfikację obrazów rozpadu układu srebrochlonego. Jednak działania fitoncydów nie badał.

Badania J. Kamniewa wykazały, że działaniem fitoncydów na nerwy ssaków można powodować w nich nieodwracalne zmiany — może można byłoby doszukać się tu jakiejś bardzo odległej analogii z działaniem fitoncydów na układ srebrochlony *Ciliata*.

Prace B. Tokina, A. Kowalenok i Klein'a posłużyły mi jako podstawa i kontrola dla mojej pracy — praca Tokina i Kowalenok umożliwiła mi ustawienie zagadnienia w nauce o fitoncydach, a praca Klein'a pozwoliła na porównanie zachowania się układu srebrochlonego przy działaniu fitoncydów i innych czynników szkodliwych.

Zadania niniejszej pracy są następujące:

1. wykazanie podobieństwa efektów działania fitoncydów w stosunku do innych substancji;
2. wykazanie zależności między zmianami morfotycznymi w układzie srebrochlonym powstałymi pod wpływem fitoncydów a zmianami w zachowaniu się *Paramecium*;
3. wyjaśnienie miejsca powstawania i rozchodzenia się zmian morfotycznych zachodzących pod wpływem fitoncydów.

Materiał i technika pracy

1. Doświadczenia zostały wykonane na *Paramecium caudatum* Ehrb. Zaletą tego obiektu jest przede wszystkim dobre opracowanie fizjologiczne, a oprócz tego to, że większość prac nad działaniem fitoncydów na pierwotniaki została przeprowadzona na tym obiekcie, przez co uzyskuje się lepszą porównywalność wyników. Jako tło porównawcze mogą służyć badania Tokina nad innymi pierwotniakami. Zostały użyte zarówno czyste linie, jak i hodowle zwykłe (jednogatunkowe). Stosowanie czystej linii umożliwia lepszą porównywalność wyników w obrębie klonu — wadą jego jest gorsza porównywalność z innymi hodowlami.

Stosowanie hodowli zwykłej bardziej zbliża warunki eksperymentów do warunków naturalnych, ponieważ działamy tu na populację w sensie ekologicznym. Umożliwia też ono ogarnięcie „rozrzutu“ zjawisk przez obserwowanie bardziej różniących się od siebie osobników. B. Klei n w swojej pracy (4 i 5) stosował wyhodowane przypadkowo na pożywkach roślinnych różnogatunkowe hodowle pierwotniaków.

2. Jako źródło fitoncydów została zastosowana cebula (*Allium cepa* L.) — klasyczny materiał do badań nad fitoncydami. Nie spotkałem się w dotychczasowych pracach ze stosowaniem określonych odmian cebuli, jednak wydaje się, że stosowanie jednej określonej odmiany da rezultaty bardziej współmierne. Stosowałem cebulę odmiany „żytańska“, zebraną jednego dnia z jednego pola we wsi Zawady koło Wilanowa, przechowywaną w jednakowych warunkach.

3. Dla uzyskania wyników porównywalnych z pracami Tokina i innych stosowałem jego metodę, która też była stosowana w pracach kierowanych przez śp. prof. H. R a a b e. Polega ona na tym, że działa się lotnymi frakcjami fitoncydów na kroplę hodowli z pierwotniakami umieszczoną na szkiełku przedmiotowym wstawionym do szalki Petri przykrytej drugą szalką. Starłem się o zachowanie jednakowej temperatury przez czas trwania doświadczenia.

4. Stosowałem następujące rodzaje obserwacji:

- a) obserwacje pod lupą preparacyjną,
- b) obserwacje pod mikroskopem kontrastowo-fazowym w kroplli wiszącej,
- c) obserwacje w ciemnym polu przy zastosowaniu Cardiff-kondensora,
- d) impregnacja azotanem srebra według metody Klei n'a.

Do suszenia kropli z wymoczkami zastosowałem elektryczny osuszacz (föhn). W razie dużego zachmurzenia stosowałem do wyświetlania zwykłą lampę (żarówka 100 W), co, jak się przekonałem, daje równie dobre rezultaty, jak naświetlanie słoneczne. Z tego wynika, że zalecane w tym wypadku stosowanie lamp kwarcowych nie jest konieczne.

Prócz preparatów z uszkodzonym przez działanie fitoncydów układem srebrochłonnyim robiłem też przy każdym doświadczeniu preparaty kontrolne, które trzymałem przez cały czas eksperymentu (wraz z barwieniem) w tych samych warunkach co inne, z wyjątkiem zadziałania cebulą.

Dozowanie lotnych frakcji fitoncydów

Autorzy prac nad fitoncydami stosowali odważoną ilość miazgi cebuli, położonej w zamkniętej szalce Petri danej objętości. Jest jednak rzeczą jasną, że ilość parujących substancji lotnych jest zależna nie tylko od wagi miazgi, z której pochodzą, ale przede wszystkim od jej powierzchni. Ponieważ uzyskanie jednolitej powierzchni miazgi jest praktycznie niewykonalne, więc zastosowałem sok cebuli jako źródło lotnych frakcji. Określoną objętość soku wkraplałem pipetą na określoną powierzchnię (obramowaną parafiną) na szkiełku przedmiotowym, które następnie wstawiałem do szalki Petri. W każdym doświadczeniu stosowałem też określoną objętość i powierzchnię kropli z kulturą, rozlaną na szkiełku. Przy porównywaniu obserwacji nad działaniem par soku i par miazgi należy mieć na uwadze, że wyniki mogą być nieco odmienne.

Niewątpliwie podana wyżej metoda dozowania nie jest ścisła — należałoby stosować naczynia lepiej uszczelnione przy ścisłej kontroli ciśnienia i temperatury — jednak została ona zastosowana z powodu swej prostoty i możliwości porównywania wyników z wynikami uzyskanymi przez B. Tokina. Autor ten zresztą podaje, że on sam porzucił metody bardziej skomplikowane dla swojej metody szalki Petri.

Zresztą zasadnicze trudności w dozowaniu wynikają przede wszystkim z niejednakowego reagowania poszczególnych osobników (zależność od stadium rozwoju ontogenetycznego — A. Kovalenok) i z niejednakowych właściwości soku jednej cebuli. Ulepszenie metody dozowania niewiele zmieniłoby postać rzeczy.

Tabela IV.

Powierzchnia parująca 2 cm², 0,5 ml soku temp. 21° C.

Nr szalki	Czas zamkn.	% ginących	Cz. zamkn.	% ginących	Cz. zamkn.	% ginących
1	42	10 %	47	50 %	55	100 %
2	44	10 %	48	60 %	60	100 %
3	36	10 %	45	70 %	51	100 %
4	35	25 %	42	50 %	50	100 %
5	30	10 %	44	50 %	45	100 %
6	25	5 %	40	50 %	48	100 %
7	23	10 %	31	50 %	47	100 %
8	25	40 %	29	50 %	39	100 %

OBJASNIENIE TABEL

Tablice ilustrują zależność czasu umierania i zmian w ruchu *Paramecium caudatum* od powierzchni parującego soku cebuli. Sok rozlany na szkiełkach pokrytych parafiną z wycięciami o danej powierzchni w objętości 0,25 ml na 1 cm². Kropla z kulturą o objętości 0,25 ml, powierzchni 4 cm² umieszczona na drugim szkiełku obok soku. Całość zamknięta w szalce Petri. Pierwsza rubryka od lewa oznacza czas trwania doświadczenia w godzinach i minutach. Pierwsza rubryka każdej pory oznacza charakter ruchu, druga procent ginących wymoczków.

- + + ruch ożywiony
- + ruch normalny
- ruch zwolniony
- — ruch bardzo zwolniony, obroty.

EXPLANATION OF TABLES

The tables illustrate the dependence of the period of dying and of the modifications of the movement of *Paramecium caudatum* on one side and of the surface of the evaporating onion juice on the other. The juice is extended on slides covered with paraffin in the surface of which were made incisions of definite dimensions, 0,25 ml on 1 cm² of the surface. The drop with the culture, of 0,25 ml and having the surface of 4 cm² was placed on another slide near the juice. Both slides were dosed in a Petri dish.

The first column from the left gives the duration of the experiment in hours and minutes. The first column in each pair contains characteristics of the motion, the second one — the percentage of dying ciliates.

- + + increased motion
- + normal motion
- slow motion
- — very slow motion, rotations.

Z powyższych danych widać, że daje się stwierdzić pewna zależność czasu umierania od powierzchni parującej soku, jednak nie otrzymuje się ściśle porównywalnych wyników. Staje się konieczne dozowanie nie na czas, ale na efekt. Np. właściwe będzie nie robienie preparatów po upływie dwóch godzin od zadziałania dwóch centymetrów kwadratowych soku, ale robienie ich wtedy, kiedy ustanie ruch rzęsek u wszystkich wymoczków z zanotowaniem czasu, kiedy to nastąpiło. Wynika z tego, że istnieją pewne trudności w bezwzględnym określeniu zmian w danych warunkach i w danym czasie — jednak możliwa jest przybliżona orientacja w tych sprawach i zawsze można ustalić następstwa czasowe zmian względem siebie.

Opis spostrzeżeń

1. W pierwszej fazie działania lotnych frakcji fitoncydów cebuli daje się zauważyć, zgodnie ze spostrzeżeniami A. K o v a l e n o k, wzmożony ruch wymoczków.

2. Następnie ruch staje się coraz wolniejszy, przy czym poza zmniejszeniem się jego prędkości dodatkowe efekty nie występują.

3. W dalszym etapie działania fitoncydów zaznaczają się przy zwolnionym ruchu postępowym zakłócenia w ruchu obrotowym. Zachodzą często nieregularne obroty dookoła przemieszczającej się osi obrotów, która może zajmować położenie pionowe, poziome, bądź jakiegokolwiek inne. Jak wykazują obserwacje w ciemnym polu, ruchy takie są wynikiem braku koordynacji ruchu całych partii rzęsek.

Niekiedy występuje typ ruchu, który można byłoby określić jako „karykaturalną nutację“ tj. nutację o większej amplitudzie wahań niż normalnie. Niekiedy ciało wygina się łukowato, czasem pozostając pewien czas w tej pozycji, prócz tego obracając się.

Bardzo wczesnie, w stosunku do działania innych trucizn, ustaje działalność wodniczki tętniącej, bo jeszcze przy początkach zakłóceń w ruchu obrotowym. Zbiorniki wodniczek znacznie powiększają swoje rozmiary.

4. Po ustaniu ruchów całego ciała, gdy wymoczek już stoi w miejscu, można zaobserwować przy zastosowaniu ciemnego pola zupełnie nie skoordynowane, drżące wahadłowe ruchy pojedynczych rzęsek. Często zupełny zanik ruchu rzęsek postępuje od przodu, przy czym — rzecz ciekawa — w zanikaniu ruchu można się dopatrywać pewnej koordynacji, której już brak w samym ruchu. Zanikanie nieregularnych

ruchów rzęsek robi wrażenie pewnego postępującego, jakby kierowanego procesu. Podczas kiedy nieregularne ruchy rzęsek mogą trwać czasem godzinę i więcej, zanikanie ich przeważnie trwa kilkadziesiąt sekund.

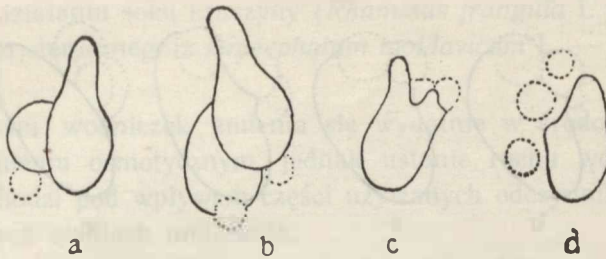
Jeszcze przed ustaniem ruchu (zgodnie ze spostrzeżeniami A. K o v a l e n o k) kształt ciała *Paramecium* zaczyna się zaokrąglać i macronucleus staje się widoczny. W jednym wypadku zobaczyłem też i micronucleus.

5. Po ustaniu ruchu rzęsek kształt ciała ulega dalszym zmianom — oprócz zaokrąglania się tworzą się często duże nabrzmienia w różnych miejscach ciała. Jak to widoczne w ciemnym polu, układ srebrochlony³⁾ pozostaje jeszcze na powierzchni tych obrzęków. W tych wypadkach widywałem wzniesiony układ powierzchniowy lub subpellikularny. Oczywiście jeżeli był wzniesiony układ subpellikularny, to i powierzchniowy, ale w wypadkach, gdy był widoczny układ powierzchniowy, mogłaby zachodzić możliwość oddzielenia się go od układu subpellikularnego. Jednak takie oddzielenie się nie wydaje się w ogóle możliwe na podstawie licznych doświadczeń m. in. szkoły J. Gelei.

6. Plazma wypływa z obrzęków⁴⁾ (często zresztą wypływa bez ich pojawienia się, bezpośrednio z nabrzmiałego ciała). Niekiedy widać pęknięcie w pellikuli w obu układach przez które wylewa się plazma (ryc. 1c). Plazma tworzy krople przylegające do powierzchni ciała. Po wypłynięciu ich na powierzchnię nabrzmienia nieco opadają (rys. 2 abc). Następnie ciało kurczy się przybierając kształt butelki lub gruszki (jak to obserwowała i A. K o v a l e n o k). Krople w wodzie się nie rozpuszczają, zachowują swoją odrębność, w ciemnym polu mają zielonkawy odcień i są optycznie jednorodne, co też obserwowali inni badacze. Wiele kropel po pewnym czasie odrywa się przybierając kształt dokładnie kulisty (rys. 1 d). Można sztucznie spowo-

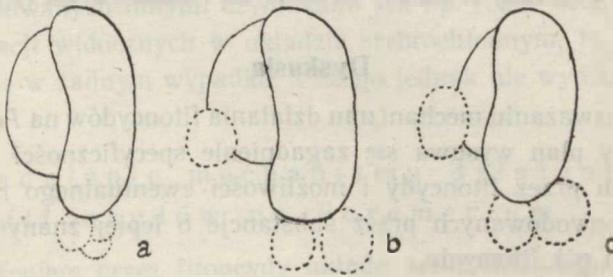
³⁾ W utworach impregnujących się srebrem u *Paramecium* należy wyróżnić dwa zespoły: a) układ powierzchniowy widoczny jako system pól wielokątnych nazwany przez B. Klein'a „niebezpośrednim układem srebrochlonym“, a przez E. Chatton'a i A. L w o f f'a „argyromem“, b) układ subpellikularny składający się m. in. z ciałek bazalnych rzęsek i łączących je fibrylli nazwany przez Klein'a „bezpośrednim układem srebrochlonym“, a przez Chatton'a i L w o f f'a „infraciliaturą“.

⁴⁾ W jednym wypadku obserwowałem jej wypłynięcie przed ustaniem ruchu.



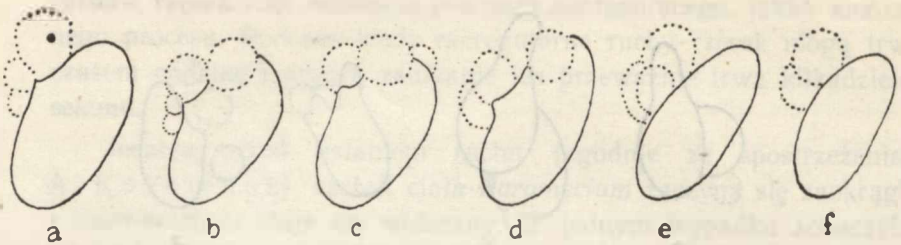
Rys. 1. Schematyczny rysunek *P. caudatum* po zadziałaniu fitoncydami w okresie po ustaniu ruchu. Ciągła linia oznacza pellikulę, przerywana — wylew hyoplazmy. a) Widoczne nabrzmienie subpellikularne i wylew na jego powierzchni. b) Tworzenie się wylewów hyoplazmy zarówno na powierzchni nabrzmienia subpellikularnego jak i w innym miejscu ciała. c) Widoczne pęknięcie w pelliculi, z którego wypływa hyoplazma. d) Ten sam osobnik po obróceniu go przez trącenie szkiełka nakrywkowego. Krople hyoplazmy odrywają się.

Fig. 1. Schematic figure of *Paramecium caudatum* subjected to action of phytoncides. The figure presents the individuals just after cessation of movement. Continuous lines represent the pellicle, dotted ones the hyaloplasmic vesicles. a) Subpellicular swelling and vesicles on its surface are visible. b) Formation of hyaloplasmic vesicles both on the surface of the subpellicular swelling and on other parts of the body. c) Rupture of the pellicle giving out of the hyaloplasm. d) The same individual turned over by a light push of the cover-glass. The hyaloplasmic drops are separating themselves.



Rys. 2. Ten sam osobnik rysowany w odstępach 15-to minutowych. a) Widoczne nabrzmienie subpellikularne i niezależnie od niego wylewy hyoplazmy. b) Wylew hyoplazmy na powierzchni nabrzmienia. c) Powiększenie się wylewu przy opadaniu nabrzmienia.

Fig. 2. Aspects of the same individual drawn at 15 min. intervals. a) Subpellicular swelling and vesicles independent of it are visible. b) Hyaloplasmic vesicles appearing on the surface of the swelling. c) Growth of the vesicles corresponding to shrinking down of the swelling.



Rys. 3. Widoczne małe nabrzmienie subpellikularne oraz wylew hyaloplazmy z początku wzrastające (a, b, c), następnie odrywające się (d, e, f). Pierwszy rysunek — zrobiony w jedenastej minucie działania lotnych frakcji fitoncydów, następne wykonane w odstępach 10 minutowych. Obserwacja w kropli wiszącej.

Fig. 3. Small subpellicular swelling and hyaloplasmic vesicles at first increasing (a, b, c), then separating themselves (d, e, f). First figure drawn in the eleventh minute of the action of the vapours of the phytoncides, following ones at 10 minute intervals. Observed in a hanging drop.

dować ich oddzielanie się przez posunięcie szkiełka nakrywkowego tak, by wymoczek obrócił się dookoła osi poziomej.

7. Obraz śmierci na preparatach z uwidocznionym układem srebrochlonym.

Widoczne są perforacje w kształcie okrągławych dziur w obu układach, powierzchniowym i subpellikularnym (mikrofotografia 2). Zanikają fibrylle między ciałkami bazalnymi rzęsek, same ciałka grubieją i stają się wyraźnie widoczne. Posługując się klasyfikacją B. Klei n'a obrazy te należy zaliczyć do frakturowego typu rozpadu.

Dyskusja

Przy rozważaniu mechanizmu działania fitoncydów na *Paramecium* na pierwszy plan wysuwa się zagadnienie specyficzności zmian powodowanych przez fitoncydy i możliwości ewentualnego nawiązania do zmian powodowanych przez substancje o lepiej znanym składzie chemicznym niż fitoncydy.

a. Co do zmian w ruchu *Paramecium* to nieregularne obroty występują również przy działaniu wielu substancji szkodliwych, np. soli.

Jednak przy działaniu fitoncydów obroty te są szczególnie chaotyczne i wykazują podobieństwo do ruchów wymoczków przy zadziałaniu kofeiną opisanym przez B. Klei n'a.

b. Wczesne zatrzymanie się wodniczek tętniących jest bardzo charakterystyczne dla działania fitoncydów. Zachodzi również przy

bezpośrednim działaniu soku kruszyny (*Rhamnus frangula* L.) i przy działaniu olejku eterycznego z *Dracephalum moldavicum* L. — B. Tokin (8).

Okres ruchu wodniczek zmienia się wydatnie w środowiskach o różnym ciśnieniu osmotycznym, jednak ustanie ruchu wodniczek tętniących zachodzi pod wpływem części używanych odczynników dopiero w dalszych stadiach umierania.

Według I. Kono kofeina w stężeniu 1,25 : 1000 nie jest dla *Paramecium* trująca, ale wstrzymuje działanie wodniczek tętniących i wywołuje skulanie się.

c. Co do powstawania wylewów plazmy, to tworzą się one pod wpływem działania bardzo wielu czynników.

Bungenberg de Jong i Hartkamp podają następujące: wzrost temperatury, ucisk szkiełka nakrywkowego, promienie ultrafioletowe i Roentgena, zranienie igłą mikromanipulatora, hipotoniczne środowisko, dodanie do pożywki bardzo różnych substancji, zarówno elektrolitów jak i nieelektrolitów.

Pęcherzyki powstające przy działaniu fitoncydów odznaczają się jednak dużą wielkością, choć np. pęcherzyki powstające przy działaniu xylenu są większe⁵⁾.

d. Obrazy rozpadu układu srebrochłonnego uzyskiwane na preparatach po zadziałaniu fitoncydami cebuli są podobne do obrazów rozpadu uzyskiwanych innymi czynnikami jak np. różne sole, kofeina. Co do perforacji widocznych w układzie srebrochłonnym, to Klein ich nie opisuje w żadnym wypadku, z czego jednak nie wynika, że ich nie widział.

Zagadnienie mechanizmu działania fitoncydów na *Paramecium*

Za porażeniem przez fitoncydy układu srebrochłonnego przemawiają następujące argumenty:

1. Cytowane wyżej stwierdzenie B. Klein'a, że wszystkie czynniki szkodliwe działają najpierw na układ srebrochłonny.

⁵⁾ Pewne dane porównawcze zawdzięczam uprzejmości kol. mgr. Sławomira Kozłowskiego, który podzielił się ze mną swymi nie publikowanymi obserwacjami.

2. Zachowanie się *Paramecium* świadczące o zanikaniu koordynacji ruchu rzęsek. Zmiana fizjologiczna winna mieć swój aspekt morfologiczny.

Ponieważ stwierdzono (W. Milicer), brak roli neuromotorium w koordynacji ruchu rzęsek całego ciała u *Paramecium*, należy więc szukać źródła zakłóceń ich ruchu w układzie srebrochłonnym.

3. Powstawanie pęcherzy i wylewów cytoplazmy musi z natury rzeczy być związane ze zmianami w układach pellikulinarnym i srebrochłonnym.

4. Zanikanie fibrylli między ciałkami bazalnymi i perforacje w obu układach bezpośrednio dowodzą wpływu fitoncydów na układ srebrochłonny. Jednak zachodzi to dopiero w ostatnim stadium, przed samą śmiercią (przy ruchu pojedynczych rzęsek) i niedługo po niej. Można jednak przypuścić, że zmiany fizjologiczne następują w fibryllach wcześniej od morfologicznych i tłumaczą brak koordynacji ruchu partii rzęsek.

Możliwe, że działanie na układ srebrochłonny nie jest bezpośrednie i że fitoncydy działają najpierw na jakieś inne elementy, które z kolei powodują zmiany w układzie srebrochłonnym.

Zatrzymanie się wodniczki tętniącej może dałoby się nawiązać do uszkodzenia układu powierzchniowego — może np. jego rozpad mógłby spowodować zablokowanie ujścia jej zbiorniczka. Możliwe również byłoby porażenie jakichś nieznanymi ośrodków zawiadujących działalnością wodniczki tętniącej. Należy jednak zaznaczyć, że zatrzymanie się wodniczki zachodzi na długo przed ujawnieniem się zmian morfologicznych w układzie srebrochłonnym. Możliwe, że zachowanie się wodniczki tętniącej jako m. i. organelli wydalania układu oddechowego, należałoby interpretować w myśl przypuszczenia B. Tokina o działaniu fitoncydów na oddychanie.

Przy rozważaniu mechanizmu działania fitoncydów nie można też pominąć faktu uwidoczniania się makronucleusa, które musi również oznaczać jakieś zmiany fizjologiczne.

Tworzenie się pęcherzy na powierzchni *Paramecium*

Jak wspomniałem wyżej, tworzenie się wylewów plazmy nie jest dla fitoncydów specyficzne i rozważania na ich temat mają znaczenie ogólne.

Child i E. Deviney dochodzą do wniosku, że w wielu wypadkach pęcherzyki zawierają płynne części endoplazmy, które zostały przepchnięte przez mechanicznie słabsze części ektoplazmy. W niektórych wypadkach widzieli, że pellikula była podniesiona i obserwowali, że ścianki pęcherzyków w sposób ciągły w nią przechodziły.

W zastosowaniu tej hipotezy do zjawisk spowodowanych fitoncydami natrafiamy jednak na pewne trudności. Pęcherzyki są optycznie jednorodne, a endoplazma *Paramecium* przecież taka nie jest. Można byłoby jednak przyjąć pewne odfiltrowywanie się elementów gęstszych. Tak samo na podstawie obserwacji w ciemnym polu i analizy preparatów z uwidocznionym układem srebrochlornym nie można stwierdzić, żeby pęcherzyki przechodziły w sposób ciągły w pellikulę. Zarówno układ pellikularny, jak i srebrochlorny mają określoną strukturę i trudno byłoby sobie wyobrazić, żeby w sposób ciągły przechodziły w pęcherzyki plazmatyczne. Robi wrażenie, że te pęcherzyki przedstawiały się przez miejsca w pellikuli, miejsca o zmniejszonym oporze.

Bungenberg de Jong i Hartkamp no podstawie licznych doświadczeń wysuwają hipotezę objaśniającą fizykochemiczny mechanizm powstawania tych pęcherzyków: „W nie naruszonej komórce istnieje tendencja od elektroendosmotycznego transportu wody w konsekwencji różnicy potencjałów między wnętrzem komórki środowiskiem zewnętrznym. Ten transport wody stanie się jednak możliwy jeżeli nastąpi krótkie spięcie przez zranienie błony (prądy lokalne). Kierunek elektro-endosmotycznego transportu wody zależy od znaku ładunku elektrycznego w błonie komórkowej. Jeśli ten jest ujemny, to płyn popłynie do bieguna ujemnego, tj. do wnętrza komórki. Kiedy błona ma dostateczny stopień wytrzymałości, to można sobie wyobrazić, że nie uszkodzone części są podnoszone przez wchodzący płyn. Badacze ci podają na podstawie doświadczeń, że pęcherzyki tworzą własną błonkę na powierzchni (Surface film). H. Bundenberg de Jong i J. Hartkamp wiążą zachowanie się błony komórkowej z zachowaniem się fosfatydowych koacerwatów, co potwierdzają tworzeniem sztucznych modeli fosfatydowych tych zjawisk.

Rozważane powyżej obrazy rozpadu układu srebrochlornego w każdym razie nie byłyby w sprzeczności z taką interpretacją — obserwujemy tu zarówno wzniesienie pellikuli jak i perforacji w układzie powierzchniowym i rozluźnienia układu srebrochlornego.

Należy jednak wziąć pod uwagę możliwość roli wodniczki tętniącej w tworzeniu się pęcherzy, np. przez wypychanie cytoplazmy.

W konkluzji można powiedzieć, że przy działaniu fitoncydów mamy do czynienia z procesami zachodzącymi w komórce jako pewnej całości i podejście do tych spraw od strony tylko jednej organelli byłoby niewłaściwe, ale można stwierdzić, że w tych procesach ważną rolę odgrywa zachowanie się układu srebrochlonnego i wodniczki tętniącej.

Nawiązanie do warunków naturalnych

Niewątpliwie warunki eksperymentów nad działaniem fitoncydów na *Paramecium* zarówno w niniejszej pracy jak i w innych są sztuczne. Jednak obserwowanie zmian cytologicznych w środowisku naturalnym jest bodajże niemożliwe — samo wzięcie kropli pod mikroskop już zmienia warunki obserwacji.

Z drugiej strony warunki doświadczeń — choć celowo przejaskrawiają warunki naturalne, jednak nie są absurdalne — w przyrodzie *Paramecium* ma do czynienia z fitoncydami w rozmaitych formach.

Podaję tu wykaz roślin o właściwościach zabójczych dla pierwotniaków, z którymi *Paramecium* może mieć w przyrodzie do czynienia, wybranych ze spisu B. Tokina⁶⁾.

Rośliny wodne:

<i>Polygonum amphibium</i> L.	7 ⁷⁾	<i>Potamogeton perfoliatus</i> L.	169
<i>Potamogeton natans</i> L.	130	<i>Utricularia vulgaris</i> L.	330

Rośliny rosnące na mokrym podłożu, których części mogą okresowo znajdować się pod wodą:

<i>Acorus celamus</i> L.	20	<i>Menyanthes trifoliata</i> L.	13
<i>Arum elongatum</i> Stev.	25	<i>Glyceria aquatica</i> (L.) W a h b.	100
<i>Sambucus ebulus</i> L.	40	<i>Hippuris vulgaris</i> L.	49
<i>Viburnum opulus</i> L.	15	<i>Lisimachia numularia</i> L.	105
<i>Scirpus lacustris</i> L.	17	<i>Ribes nigrum</i> L.	10
<i>Equisetum heleocharis</i> Ehrh.	43	<i>Ribes saxatile</i> Pall.	12
<i>Oxycoccus palustris</i> Pers	8	<i>Cicuta virosa</i> L.	24

Należy się liczyć z faktem, że w warunkach naturalnych działanie fitoncydów może się przedstawiać odmiennie niż w warunkach doświadczeń i stąd ich względne własności toksyczne mogą być inne

⁶⁾ Wybranie tych roślin ze spisu B. Tokina zawdzięczam kol. Alinie Michalskiej, asystentce Ogrodu Botanicznego.

⁷⁾ Liczby podane oznaczają czas ekspozycji w minutach, w których — w warunkach eksperymentu — następuje śmierć pierwotniaków.

niż w podanym spisie. U wielu roślin wodnych nie wykryto w ogóle właściwości pierwotniakobójczych — ciekawe byłoby zbadanie, jaki ma wpływ skład gatunkowy flory zbiornika wodnego na jego mikrofaunę.

Rośliny wodne, u których nie wykryto własności fitoncydów:

Sagittaria sagittifolia L.
Ceratophyllum demersum L.
Elodea canadensis Rich.
Hydrocharis morsus-ranae L.

Lemna minor L.
Nymphaea alba L.
Nuphar luteum (z.) Sm.
Polygonum scrubum Hoench.

S t r e s z c z e n i e

1. Badano wpływ lotnych frakcji fitoncydów, wydzielanych przez określone powierzchnie soku cebuli.
2. Stwierdzono, że przy działaniu fitoncydów zachodzi rozpad układu srebrochłonny według typu frakturowego i że w układzie powierzchniowym i subpellikalarnym powstają liczne perforacje.
3. Stwierdzono, że przy działaniu lotnych frakcji fitoncydów bardzo wcześnie następuje zatrzymanie się wodniczki tętniącej.

Na zakończenie chciałbym wyrazić wdzięczność tym wszystkim, którzy pomogli mi przy wykonaniu niniejszej pracy. Przede wszystkim winien jestem wdzięczność śp. Prof. dr. Henrykowi R a a b e, z którego inicjatywy i pod którego kierunkiem zaczynałem tę pracę, Prof. dr. Zdzisławowi R a a b e, który to kierownictwo podjął w dalszym ciągu oraz Prof. Janowi D e m b o w s k i e m u, który zechciał moją pracę przeczytać przed drukiem i udzielić mi cennych wskazówek. Składam też podziękowanie Prof. dr. Tadeuszowi J a c z e w s k i e m u, w którego Zakładzie praca ta była wykonana. Dziękuję też Prof. dr. Zygmuntovi K r a c z k i e w i c z o w i oraz Prof. dr. Józefowi S z u l e c i e i asystentom w Ich Zakładach za pomoc w mikrofoto-
grafiach i udostępnienie aparatury.

BIBLIOGRAFIA

1. Bungenberg de Jong H. G. and Hartkamp J. L. L. F. — On the formation of hyaline vesicles at the surface of *Paramecium caudatum*. *Protoplasma*. Berlin, XXXI, 4, 1938.
2. Child C. M. and Deviney E. — Contribution to the physiology of *Paramecium caudatum*. *Journal of Experimental Zoology*, Philadelphia. 43, 1926.
3. Jirovec O. — Pouziti nalevniku *Glaucoma piriformis* ke zjistení toxicity některých latek důležitých ve farmakologii. *Vestník Čsl. zoologické společnosti*, Praha, 11, 1947.
4. Klein B. M. — Reaktionen des Silberlinien-systems auf Schädlichkeiten; I. *Bollettino del Laboratorio di Zoologia Agrario e Bachicoltura del R. Istituto Superiore Agrario di Milano*, Parma, IV, 1934.
5. Klein B. M. — Reaktionen des Silberlinien-systems auf Schädlichkeiten; II. *Bollettino del Laboratorio di Zoologia Agraria e Bachicoltura del R. Istituto Superiore Agraria di Milano*, VI, 1934—35.
6. Kono I. — Untersuchungen zur Frage der Vitalfärbung und deren Beeinflussung durch Gifte. *Protoplasma*, Berlin, XI, 1930.
7. Kovalenok A. — Mechanism of Action of Phytoncides upon *Protozoa*. C. R. (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S., Moskwa. XXXVIII, 7, 1943.
8. Milicer W. — Badania doświadczalne nad systemem neuromotorycznym *P. caudatum*. *Acta Biologiae Experimentalis*. Warszawa, IX, 1935.
9. Pigoń A. — The structure of the pellicle of *Paramecium caudatum* Ehrb. as revealed by micro-dissection. *C. R. Acad. Cracovie* (6—7). 1949.
10. Tokin B. — *Fitoncidy*. Moskwa, 1951.
11. Tokin B. — The influence of Phytoncide upon *Protozoa*; C. R. (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S. Moskwa, XXXVIII, 7, 1943.

РЕЗЮМЕ

Автор предпринял эту работу, чтобы получить новые экспериментальные данные, относящиеся к механизму действия фитонцидов на *Paramecium caudatum* Ehrbg. и определить связь морфологических изменений, происходящих в аргентофильной системе, с изменениями в движении ресничек.

Предметом исследования были аргентофильная система и сократительные вакуоли. Автор пользовался методом Клейна заключающимся в импрегнировании аргентофильной системы при помощи азотнокислого серебра.

В качестве источника фитонцидов были использованы пары лукового сока. Наблюдения под лупой проводились по методу Токина. Кроме того автор пользовался контрастно-фазовым микроскопом и микроскопом с конденсором Кардиффа для темного поля.

Получены ниже следующие результаты:

1. Установлено, что при воздействии фитонцидов происходил распад аргентофильной системы по фрактурному типу Клейна, причем в ней возникали многочисленные перфорации;
2. При действии летучих фракций фитонцидов очень быстро прекращается деятельность сократительных вакуолей;
3. Зависимость времени умирания парамециум от величины поверности испаряющегося лукового сока иллюстрируют соответствующие таблицы;
4. Ясно наблюдаемое растройство координации движений ресничек и появляющееся вследствие этого неправильное вращение инфузорий, автор приписывает изменениям, происходящим в аргентофильной системе. Эти изменения автор считает одним из основных последствий воздействия фитонцидов на парамециум.

ОБЪЯСНЕНИЕ ТАБЛПЦ

Таблицы иллюстрируют зависимость периода умирания и появления изменений в движении *Paramecium caudatum* от поверхности испаряющегося лукового сока. Сок разлит на стеклышках затянутах парафином в поверхности которого были проделаны определенных размеров отверстия 0,25 мм на 1 см поверхности. Капля с культурой объема 0,25 мл. и поверхности 4 см² находилась на другом стеклышке воле сока. Оба стеклышка помещались в чашечке Петри.

Первая рубрика слева содержит данные относящиеся к времени опыта — в часах и минутах. Первая рубрика каждой пары относится к характеру движения, вторая к проценту гибнущих инфузорий.

- ++ оживленное движение
- + нормальное движение
- замедленное движение
- очень медленное движение

Фот. 1. Аргентофильная система *P. caudatum* (нормальная)

Фот. 2. Аргентофильная система *P. caudatum* -- поврежденного действием летучих фракций фитонцидов лука.

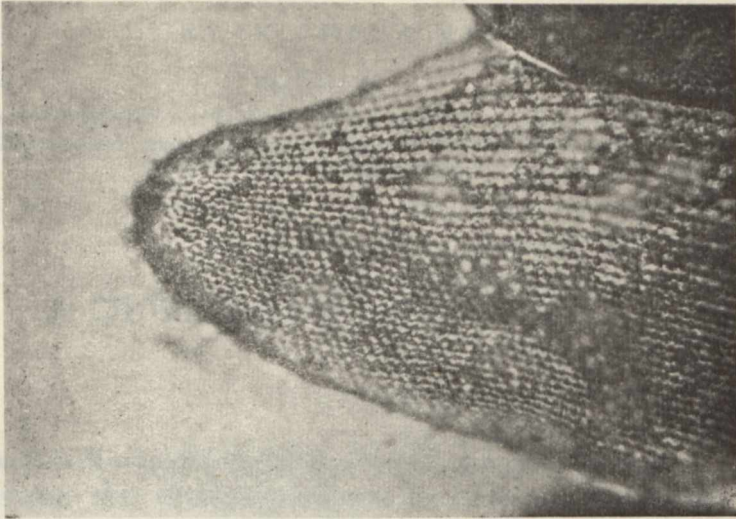
SUMMARY

The main purpose of the present investigation was to get new experimental data concerning the mechanism of the action of phytoncides on *Paramecium caudatum* and to state the connection between morphological changes occurring in the argentophil system and modifications of the ciliar motion.

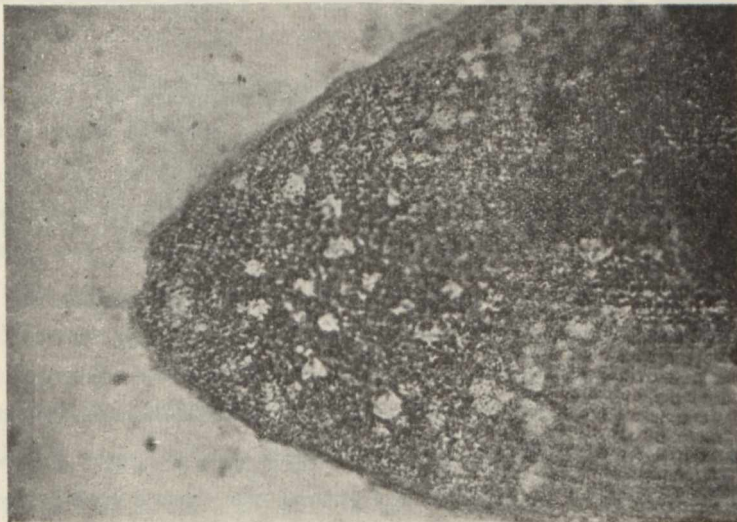
In particular the argentophil system and the contractile vacuolae were investigated. Klein's method of impregnating the argentophil system with silver nitrate was applied. As phytoncides were used vapours of the onion juice. Observations were made under a magnifying glass in the Petri dish method which was used by Tokin. Besides a microscope and a cardiff-condensor for the dark field were used.

The results obtained were as follows:

- 1) it was stated that the action of the phytoncides was followed by a desintegration of the argentophil system corresponding to what was called by Klein „Frakturtypus“ and by numerous perforations of the mentioned system.
- 2) The contractile vacuolae stop their motion at a very early stage of the action of the phytoncides.
- 3) The relation between the surface of the onion juice producing vapours and the time at which death of *Paramecium* occurs is shown on the enclosed tables.
- 4) Coordination disturbances in the motion of the cilia and the irregular rotations of the ciliates are explained as being due to changes in the argentophil system. These changes are considered as one of the main effects of the action of phytoncides on *Paramecium*.



Fot. 1. Układ srebrochlony *P. caudatum* — normalny, pow. ok. 1550 x.
Phot. 1. Argentophil system of *Paramecium caudatum*, normal.



Fot. 2. Układ srebrochlony *P. caudatum* — uszkodzony działaniem lotnych
frakcji fitoncydów cebuli, pow. ok. 1550 x
Phot. 2. Argentophil system of *Paramecium caudatum* damaged by the action of
vapours of phytoncides of onion.

