

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. IV, 18

SECTIO C

15.II.1950

Z Pracowni Mikrobiologii Ogólnej Zakładu Fizjologii Roślin Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego U. M. C. S.

Kierownik Zakładu: prof. dr Adam Paszewski

Kierownik Pracowni: dr Władysław Kunicki-Goldfinger

Władysław KUNICKI-GOLDFINGER

Budowa i cykl rozwojowy rodzaju *Sporocytophaga*, Stanier

Tablice XII — XV

The structure and the life-cycle of *Sporocytophaga*, Stanier

Plates XII — XV

W obrębie grupy *Myxobacteriae* rodzaje *Sporocytophaga* i *Cytophaga* zajmują odrębne stanowisko. Według Imszenieckiego (1940, 1945 b, 1949) różnice między tymi rodzajami a pozostałymi bakteriami śluzowymi nie ograniczają się tylko do uproszczenia cyklu rozwojowego (brak mikrocyt i owocni u *Cytophaga*, a owocni u *Sporocytophaga*), lecz uwidaczniają się również w odmiennej budowie komórki. Imszeniecki znajdował u innych *Myxobacteriae* ziarno jądrowe, natomiast u *Sporocytophaga* substancja chromatynowa ma być według niego rozproszona. Cały szereg innych badaczy (Stanier 1942, Winogradsky 1929, Tchan, Pochon i Prévot 1948) opisuje u *Sporocytophaga* nukleoidy, dające barwne reakcje chromatyny. Podobnie niezgodnione do dziś pozostały kwestie wtrętów wewnątrzkomórkowych, błony komórkowej, cyklu rozwojowego itd.

Właśnie ta wielka ilość spornych punktów, związanych z cytologią i cyklem rozwojowym *Sporocytophaga*, skłoniła autora do systematycznego przebadania całości problemu.

Omawiany drobnoustrój po raz pierwszy został opisany przez Hutchinsona i Claytona w r. 1919 i z uwagi na swój kształt nazwany *Spirochaeta cytophaga*. Prace Winogradskiego (1929) doprowadziły do wyodrębnienia *Cytophaga* jako osobnego rodzaju. Badaczowi rosyjskiemu nie udało się jednak wyjaśnić roli spostrzeganych w hodowli

form kulistych, które uważał za zanieczyszczenia. Dopiero klasyczne badania Krzemieniewskiej (1933) wykazały, że istnieją dwa drobnoustroje o zbliżonych własnościach, a różniące się między sobą tylko zdolnością do tworzenia mikrocyt. Formę tworzącą mikrocyty nazwała Krzemieniewska *Cytophaga myxococcoides*, udawadniając jednocześnie, że należy ją zaliczyć do *Myxobacteriae*.

Sporocytophaga wykazuje szereg własności wspólnych z innymi bakteriami śluzowymi, np. złą barwliwość cytoplazmy, znaczną gibkość komórek, ruch pełzający, środowisko występowania (gleba) i aktywność biologiczną (rozkład poliozydów), typ wzrostu na podłożach stałych i tworzenie mikrocyt.

Imszeniecki i Sołncewa (1945) oba rodzaje włączają do nowoutworzonego przez siebie rzędu *Promyxobacteriales* w obrębie klasy *Myxobacteriae*. Soriano (1945) zalicza *Sporocytophaga* do rzędu *Flexibacteriales*, łącznie z *Flexibacteriaceae* i *Beggiatoaceae*. Stanier (1940) początkowo łączył *Sporocytophaga* i *Cytophaga* w jedną rodzinę *Cytophagaceae*, lecz następnie rozdzielił je, pozostawiając w rodzinie *Cytophagaceae* tylko jeden rodzaj — *Cytophaga*, a *Sporocytophaga* włączając do *Myxococcaceae*, przy czym opierał się wyłącznie na różnicy w cyklu rozwojowym obu rodzajów. Tchan, Pochon i Prévot (1948) tworzą w obrębie klasy *Myxobacteriae* rząd *Asporangiales*, do którego zaliczają oba pokrewne rodzaje.

Do kwestii systematycznego stanowiska *Sporocytophaga* autor wróci jeszcze w dalszej części pracy.

Cytologia *Myxobacteriae* była przedmiotem wielu badań. Wystarczy wspomnieć prace Taxtera (1904), Jahna (1924), Winogradskiego (1929), Krzemieniewskich (1928) nad *Sorangium sore-datum*, *Polyangium fuscum*, *Myxococcus* sp., *Archangium* sp. Badiana (1930, 1933a, 1933b) nad *Myxococcus* i *Polyangium*, Milovidova (1935) nad *Myxococcus ruber*, *Chondromyces crocutus*, Vahle'go (1909), Beebe'go (1941) nad *Myxoc. xanthus*, Klieneberger—Nöbel (1947) nad *Myxoc. fulvus*, *Myxoc. virescens* i *Chondrococcus exiguus*, jak również wszechstronne prace Imszenieckiego i jego współpracowników (1936, 1940, 1945b).

Natomiast cytologią *Sporocytophaga* zajmowano się stosunkowo mało. Prócz Winogradskiego (1929) bliżej opracowali ten temat — Krzemieniewska (1930, 1931), Stapp i Bortels (1934), Stanier (1942), Imszeniecki i Sołncewa (1940), Tchan, Pochon i Prévot (1948), oraz Kunicki-Goldfinger (1949). Wyniki tych badań są dalekie od wzajemnej zgodności. Przykładem tego mogą być opisy kiełkowania mikrocyt, podane z jednej strony przez

Krzemieniewską i Staniera, z drugiej zaś przez Stappa, Imszenieckiego lub Izaczenkę i Wakenguta. Podobnie rozbieżne są wyniki badań nad substancją chromatynową.

Badania własne

Materiał badań.

Badania przeprowadzono na dwóch szczepach *Sporocytophaga myxococcoides* (Krzemieniewska) Stanier 1942, o własnościach zupełnie typowych *) oraz na jednym szczepie nietypowym.

Szczep ten tworzył pigment koloru brunatnego, na pożywkach rósł znacznie wolniej i wolniej również rozkładał celulozę niż szczepy typowe. W obrazie mikroskopowym wykazywał komórki wegetatywne o kształcie typowym, lecz trochę mniejsze (grubość 0.4—0.5 μ długość 4—5 μ). Mikrocyсты znacznie mniejsze niż u *Sp. myxococcoides* (do 1.0 μ), ułożone z reguły oddzielnie, podczas gdy *Sp. myxococcoides* często tworzy podobnie jak *Sp. congregata* zbite masy mikrocyست (Tabl. XII). Mikrocyсты wykazują również różnicę w budowie błony. Drobnoustrój ten rośnie na błonniku, skrobi; na agarze z cukrami (glukoza, sacharoza, fruktoza) nie rośnie. Jako jedyne źródło azotu wykorzystuje zarówno sole amonowe, azotany, jak i asparaginę, pepton i wyciąg z drożdży. Rośnie tylko w atmosferze tlenowej i w temperaturze pokojowej; w temperaturze 37° C nie wzrasta.

Szczep różni się więc wieloma własnościami morfologicznymi zarówno od *Sp. myxococcoides*, *Sp. congregata* jak i *Sp. ellipsospora*.

Autor nie uważał jednak za celowe wyodrębnianie tego szczepu jako gatunku odrębnego od trzech dziś uznanych w klasyfikacji Bergey'a (1948).

W dalszych badaniach szczep ten oznaczono jako „szczep N”.

Metody badań.

Metody hodowli.

Do wyosobnienia drobnoustrójów stosowano wybiórczą pożywkę o składzie:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g	Molibdenian amonu . . .	ślad
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	K ₂ HPO ₄	1.0 g
CaCl ₂	0.1 g	woda destylowana . . .	1000 cc.
FeCl ₃	0.02 g	agar-agar	20.0 g

*) jeden szczep typowy autor otrzymał od Prof. dr J. Ziemięckiej z Zakł. Mikrobiol. Roln. UMCS, za co składa w tym miejscu gorące podziękowanie.

Na pożywcę tej układano wyjałowione paski bibuły, którą uprzednio gotowano w 1% ługu sodowym przez pół godziny, a następnie starannie płukano w bieżącej i destylowanej wodzie, celem usunięcia substancji hamujących rozwój *Sporocytophaga*.

Celem usunięcia zanieczyszczeń ogrzewano niekiedy hodowlę do 56° C przez 20'.

Stosowano również próbnie następujące podłoża:

	Stanier	Omeliański	Hutchinson i Clayton	Waksman i Carey I	Waksman i Carey II	Uwagi
(NH ₄) ₂ SO ₄ .	1,0	1,0	2,5	2,5	2,5	NH ₄ HPO ₄
K ₂ HPO ₄ . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
MgSO ₄ . . .	0,2	0,5	0,3	0,5	0,5	
CaCl ₂ . . .	0,1	—	0,1	—	0,02	
FeCl ₃ . . .	0,02	—	0,01	—	—	
NaCl	—	śląd	0,1	—	—	
FeSO ₄ . . .	—	—	—	0,01	0,01	
KCl	—	—	—	0,5	0,5	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	—	—	—	0,001	
woda dest. .	1000 cc	1000 cc	1000 cc	1000 cc	1000 cc	

pH wszystkich pożywek nastawiono w granicach 7,0—7,5.

Ponieważ nie stwierdzono, aby wzrost na poszczególnych podłożach wykazywał wyraźne różnice, stosowano w ciągu całych badań pożywkę Omeliańskiego, z tą różnicą, że do jej sporządzania używano wody wodociągowej lub studziennej a nie destylowanej.

Zamiast bibuły filtracyjnej stosowano również celofan, wprowadzony po raz pierwszy do metodyki hodowli *Cytophaga* przez Krzemienską (1930), a potem przez Bortelsa (1934).

Sporocytophaga hodowano również na agarze celulozowym:

(NH ₄) ₂ SO ₄ .	2,0 g	NaCl	1,0 g
K ₂ HPO ₄ . .	1,0 g	CaCO ₃ . . .	2,0 g
MgSO ₄ . . .	1,0 g	woda destylow.	500 cc
	0,5 % roztwór błonnika . . .		500 cc
	agar-agar		18 g

Roztwór błonnika przygotowano przez rozpuszczenie roztartej bibuły filtracyjnej w amoniakalnym roztworze wodorotlenku miedzi. (Do 200 cc stęż. wodorotlenku amonowego dodano 50 cc wody destylowanej i 15 g węglanu miedzi), przy ciągłym wstrząsaniu. Po rozpuszczeniu się bibuły wytrącono błonnik przy pomocy roztworu kwasu solnego (50 cc

steżonego kwasu na 1000 cc wody destylowanej). Roztwór błonnika rozcieńczono wodą destylowaną do objętości 2000 cc, a następnie dodawano doń tyle rozcieńczonego kwasu solnego, aby zanikł niebieski kolor. Wytrącony błonnik, po uwolnieniu od wodoru, który się jednocześnie wytwarza, opadł na dno. Płyn zdekantowano, a osad błonnika dokładnie wypłukano celem uwolnienia go od jonów miedzi i chloru.

Ponadto stosowano agar skrobiowy (0,5% skrobi), jak również normalną pożywkę *Omeliańskiego*, w której siarczany amonowy zastępowano azotanem potasu, peptonem, asparaginą i wyciągiem z drożdży.

Na agarze z glukozą (0,05 i 0,1%) wzrostu nie otrzymano; cukier w pożywce wyjaławiano podwyższoną temperaturą, a nie przy pomocy sączenia, co mogło przyczynić się do zahamowania wzrostu (Stanier 1942). Należy jednak zaznaczyć, że *Fahraeus* (1947) hodowała *Cytophaga* na agarze z 0,1% glukozy, zwyczajnie wyjałowionej w parze bieżącej. Autorowi nie udało się potwierdzić obserwacji szwedzkiej badaczki — być może wskutek zanieczyszczeń, zawartych w glukozie używanej przez autora, lub wskutek odmienności badanych szczepów.

Wszystkie hodowle przeprowadzano w temperaturze pokojowej.

Metody badań morfologiczno-cytologicznych.

W celu zaobserwowania zmienności formy i struktury komórki podczas rozwoju, jak również przy tworzeniu i kiełkowaniu mikrocyt, materiał z czystej hodowli na bibule wysiewano na małe kawałeczki jałowego celofanu, ułożone na agarowej pożywce *Omeliańskiego*. Co pewien czas zdejmowano kawałeczek celofanu i przykładano go górną stroną, na której wzrastała *Sporocytophaga*, do czystego, wypalonego szkiełka podstawowego, otrzymując w ten sposób coś w rodzaju preparatu odciskowego.

Preparaty takie sporządzano przez pierwszych dwanaście godzin hodowli co godzinę, a następnie po 19-tu, 24-ech, 33-ech, 48-miu, 96-ciu godzinach wzrostu i po 5, 6, 8, 10 i 12 dobach.

Obserwowano również wzrost według techniki proponowanej przez *Krzemienską* — wprost na kawałkach jałowego celofanu, zwilżonych kroplą płynnej pożywki.

Prócz preparatów niebarwionych stosowano:

1) Dla barwienia błony komórkowej: a) metodę *Gutsteina* (1924a, 1924b, 1925) — preparat utrwalano w płomieniu, następnie działano nań 5% i 30% roztworem taniny przez okres 2—3 minut, dobrze spłukiwano wodą i barwiono 0,5% wodnym roztworem fioletu kryształowego przez 1/2 do 1 minuty; lub utrwalony preparat poddawano hydro-

lizie w 10% HCl przez 24 godziny, spłukiwano wodą i barwiono 1% wodnym roztworem Victoriablau przez 15". b) metodę K n a y s i' e g o (1941 b) — preparat utrwalony gorącym, poddawano w ciągu 10' działaniu zaprawy, złożonej z 30 cc 20%-owego roztworu taniny i 70 cc nasyconego, wodnego roztworu alunu potasowego, poczem barwiono fuksyną karbową Ziehl-Neelsena. c) metodę L e w i s a (1941) — barwiono rozcieńczonym fioletem kryształowym po uprzednim zadziałaniu na zawiesinę drobnoustrojów 25%-wym roztworem soli kuchennej w celu splazmizowania komórki. d) metodę R u h l a n d a i H o f f m a n n a w modyfikacji R o b i n o w a (1947) — barwiono rozcieńczonymi barwikami (fioletem kryształowym, fuksyną) po uprzednim zadziałaniu na nieutrwalone drobnoustroje 5%-wym wrzącym ługiem sodowym. e) metodę V a h l e' g o (1909) w modyfikacji autora — preparat utrwalono alkoholem metylowym, działano nań zaprawą taninową (20%-wą) przez 15 minut, spłukiwano, zalewano roztworem chlor-cynk-jodu (30 g chlorku cynku rozpuszczono w roztworze 1 g jodu w 5 g jodku potasu i 16 cc wody) i barwiono 0,5% wodnym fioletem kryształowym przez 10 sekund.

II) Dla barwienia chromatyny (kwasu dezoksyrybozonukleinowego):

a) metodę F e u l g e n a (1924) — preparaty utrwalano płynem C a r n o y (alkohol—60 cc, chloroform—30 cc, kwas octowy lodowaty—10 cc) przez 20 min. z następującym dwukrotnym przepłukiwaniem 80% alkoholem; płynem C h a b a u d (80% alkohol — 60 cc, fenol — 15 g, formol — 5 cc, kwas octowy lodowaty — 2 cc), alkoholem metylowym przez 5—10', alkoholem etylowym przez 3 do 6 godzin; ponieważ utrwalanie alkoholem metylowym dawało takie same wyniki jak przy stosowaniu innych środków utrwalających — w dalszych badaniach stosowano wyłącznie metanol. Jako odczynniki w metodzie F e u l g e n a używano: 1) 1 n HCl, 2) odczynnik S c h i f f a: fuksyna Diamant G r u e b l e r — 1 g, woda destylowana — 200 cc: do powyższego roztworu dodawano 3,3 cc 30% roztworu kwaśnego siarczynu sodowego, a po upływie godziny 20 cc 1 n HCl. Po 24 godzinach odczynnik ulegał odbarwieniu i przybierał barwę lekko żółtawą; 3) roztwór do spłukiwania (0,3 g kwaśnego siarczynu sodu w 200 cc wody i 10 cc 1 n HCl).

Prócz fuksyny Diamant G r u e b l e r wypróbowano fuksynę M e r c k, C i b a i R.A.L. Najlepsze wyniki otrzymano z fuksyną Diamant.

Samo barwienie przeprowadzono według oryginalnego przepisu F e u l g e n a: hydroliza w zimnym 1 n HCl przez 1', następnie hydroliza 1 n HCl w temperaturze 60° C przez 15', spłukanie zimnym HCl i wodą, barwienie odczynnikami S c h i f f a przez półtora godziny, trzykrotne spłukanie roztworem siarczynu i wodą. Stosowano również następujące modyfikacje oryginalnej metody: T o m a s s i' e g o (wg K n a y s i' e g o

1946c) — hydroliza ciepłym HCl przez 2', barwienie odczynnikiem Schiffa przez 2 godz.; Imszenieckiego (1945) — hydroliza ciepłym HCl przez 7 godzin, barwienie zredukowaną fuksyną przez 3 godziny; Stille'go — hydroliza 1 n HCl przy temp. 40° C w ciągu godziny. W systematycznych badaniach posługiwano się wyłącznie fuksyną Diamant Gruebler i stosowano modyfikację Stille'go.

b) metodę Piekarskiego (1937) i Robinowa (1947) — preparat utrwalony alkoholem metylowym lub płynem Chabaud poddawano hydrolizie 1 n HCl przy temp. 60° C w ciągu 10', poczem barwiono barwikiem Giemsa (2 krople barwika na 1 cc wody destylowanej) przez okres 3 godzin.

c) metodę Vendrely-Lipardy (1946) w modyfikacji Pieszkowa (1946) — Odczynniki: wyciąg rybonukleazy przygotowany w sposób następujący: świeża śledzionę bydlęcą rozcierano w jałowym moździerzu z pięciokrotną ilością wody destylowanej, odstawiono do lodówki na przeciąg 4 godzin, odwirowano przy ca 4.000 obrotów na minutę przez 30', alkalizowano przy pomocy 1 n NaOH do odczynu obojętnego, ogrzewano przez pół godziny na łaźni wodnej (100° C) celem zniszczenia dezoksyrybozonukleazy (Tulasne i Vendrely 1947).

Preparaty utrwalone płynem Chabaud poddawano działaniu wyciągu enzymatycznego na przeciąg 45', splukiwano wodą i barwiono barwikiem Giemsa jak w metodzie Robinowa.

d) metodę Beebe'go (1941) — preparat utrwalano alkoholem metylowym przez 5', barwiono anilinowym fioletem kryształowym przez 5', splukiwano wodą, działano przez 5' płynem Lugola i odbarwiano w ciągu 2—10" przy pomocy 50%-wego alkoholu.

e) hematoksylinę — preparat utrwalano alkoholem metylowym, działano przez 2 godziny 4% roztworem ałunu żelazowego i barwiono hematoksyliną Delafielda przez półtora godziny. Preparatów nie różniczkowano.

f) zieleni metylową — po utrwaleniu alkoholem metylowym.

III) Dla barwienia wtrąтів wewnątrzkomórkowych:

1) Wolutyna:

a) błękitem metylenowym Loefflera.

b) metodą Mayera (wg Knaysi'ego 1942) — preparaty barwiono błękitem metylenowym Mayera (1 cc nasyconego alkoholowego roztworu barwika w 10 cc wody) i odbarwiano w 1% kwasie siarkowym przez 1'.

c) metodą Clarka i Mitchella (1942) — barwienie błękitem metylenowym Loefflera przez 5", po splukaniu wodą — odbar-

wianie 1% kwasem siarkowym przez 5'', działaniem płynem Lugola przez 30'' i podbarwianie wodną safraniną przez 5.

r) 0,005% wodnym roztworem czerwieni obojętnej w preparacie nieutralnym pod szkiełkiem nakrywkowym.

e) metodą Knaysiego (1943b, 1946b) — do szeregu probówek dano po 5 cc 1% roztworu K_2HPO_4 , po czym do pierwszej z nich dodawano 0,1 cc wody destylowanej, do drugiej — 0,1 cc 1 n HCl, do trzeciej — 0,2 cc 1 n HCl, do czwartej — 0,3 cc 1 n HCl. Otrzymano w ten sposób roztwory o różnych stężeniach jonów wodorowych. pH oznaczano tylko w przybliżeniu, kolorymetrycznie, w granicach 2 do 6. Następnie do każdej probówki dolewano po 0,1 cc 1% wodnego roztworu błękitu metylenowego.

Tak przygotowanymi barwnikami barwiono zawiesinę drobnoustrojów pod szkiełkiem nakrywkowym. Jak wykazał Knaysi wolutyna barwi się przy pH bardzo niskim (do 2,0) natomiast protoplazma dopiero przy pH 4 i wyższym.

Ponadto celem odróżnienia wolutyny od chromatyny badano w preparatach nieutralnych rozpuszczalność barwiących się ziarn w następujących rozpuszczalnikach: w wodzie o temp. 80°C w ciągu 10', w wodzie wrzącej w ciągu 1', w 1% H_2SO_4 w ciągu 15'', w rozcieńczonym kwasie solnym, w kwasie octowym lodowatym, w 0,02% $KHCO_3$ w ciągu 2—3 godzin, w chlorallhydracie, eterze, chloroformie, alkoholu, acetonie (Lewis 1941, Knaysi 1943b).

2) Tłuszcze:

preparaty barwiono Sudanem III przez 25', płynem Lugola i badano rozpuszczalność w rozpuszczalnikach tłuszczowych.

3) Glikogen, jogen lub skrobia:

preparaty barwiono płynem Lugola.

4) Błonnik:

preparat poddawano działaniu stężonego H_2SO_4 , a następnie roztworu jodu, lub działano nań chlor-cynk-jodem.

5) Celem sprawdzenia obecności wtrętów białkowych działano na preparat odczynnikiem Millona (1 cc rtęci rozpuszczono w 9 cc HNO_3 stężonego). Na preparat nalewano odczynnik i wielokrotnie go podgrzewano aż do ukazania się pary, następnie starannie splukiwano wodą i zanurzano na 1' w 1% HNO_3 celem rozpuszczenia precypitatu rtęci. Wiele bakteryjnych inkluzji białkowych barwi się w tej metodzie na kolor żółtawo-czerwonawy lub czarny (Knaysi 1943a, Nicolosi 1947).

Wykonano również odczyn Millona z masą bakteryjną.

Ponadto zastosowano próbę Sharpa (wg Knaysi 1943a) na białko: Preparaty zanurzano na 24 godziny w 5% glukozie o temp. 100°C

(na łaźni wodnej), następnie płukano i suszono. Inkluzje białkowe barwią się niekiedy na kolor brązowy, nie zanikający pod wpływem 10% NaOH.

Prócz tego barwiono preparaty wg metody Grama, błękitem toluidynowym, kwaśnym karminem Mayera, mucikarminem, karminem alunowym, dahlia-zielonią metylową, eozyną, wg metody Ziehl-Neelsena, Moehllera dla zarodników. We wszystkich badaniach stosowano barwiki „Ciba“, o ile w tekście nie zaznaczono innej marki.

Barwieniu wyliczonymi metodami poddano tylko preparaty z dojrzałych form wegetatywnych i z dojrzałych mikrocyt. Stadia przejściowe (na preparatach odciskowych) badano według schematu uproszczonego: barwienie hematoksyliną i metodą Robinowa dla identyfikacji chromatyny, sprawdzanie obecności wolutyny oraz w części wypadków — barwienie błony i wtrętów.

Ocena metod badania

Ostatnie lata przyniosły olbrzymi postęp w dziedzinie badań cytologicznych nad drobnoustrojami, przede wszystkim dzięki zastosowaniu nowych metod badawczych. Poznanie struktury cytoplazmy, organoidów komórki i mechanizmu jej rozwoju staje się coraz pełniejsze, nie tylko wskutek osiągnięć cytologii, ale zarówno biochemii, serologii i genetyki.

W pracy obecnej autor ograniczył się wyłącznie do metod cytologicznych. Określenie przydatności stosowanych metod identyfikacji i lokalizacji pewnych struktur komórkowych ma zasadnicze znaczenie dla oceny i interpretacji wyników. To właśnie skłoniło autora do krótkiego przedyskutowania teoretycznych podstaw wykorzystanych w tej pracy metod badawczych.

Pierwszym i zasadniczym warunkiem, który należy spełnić, aby wnioski końcowe były realne, jest rozpatrywanie morfologii i cytologii drobnoustrojów na tle całego cyklu rozwojowego organizmu przy uwzględnieniu wpływu czynników zewnętrznych.

W przebiegu cyklu rozwojowego przemianie ulega nie tylko wielkość i kształt komórki, ale również jej chemizm, zestaw enzymatyczny i całościowy kształt własności biologicznych, jak to wykazały badania Hadley'a, Mellona i innych.

Wobec ogólnie przyjętej cykliczności rozwoju bakterii śluzowych, uwzględnianie tego czynnika w badaniach cytologicznych nad tą grupą organizmów jest w znacznie większym stopniu niezbędne niż w stosunku do bakterii właściwych.

Błona komórkowa

Dwie ze stosowanych metod barwienia błony komórkowej (Gutstein, Knaysi) polegają na przesunięciu punktu izoelektrycznego i wytworzeniu nowego kompleksu chemicznego z substancji, z której zbudowana jest błona, pod wpływem odpowiedniej zaprawy (tanina, alun). Skutkiem tych zmian błona adsorbuje barwiki anilinowe, stając się jednocześnie mniej dla nich przepuszczalną. Metody Lewisa i Hoffmanna — Ruhlana opierają się na zjawisku plazmolizy, zbadanym zresztą dokładnie na wiele lat przed tym przez Eisenberga (1910). O tym, że uwidaczniane przy pomocy tych metod struktury są rzeczywiście błoną komórkową, a nie sztucznie wytworzonym produktem barwienia, przekonują nas prace Wamoschera (wg Knaysi 1946 c) nad mikrodysekcją komórki bakteryjnej i liczne prace wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego, zarówno nad bakteriami nieuszkodzonymi, jak i nad poddanymi działaniu niszczących czynników (np. fale ultradźwiękowe itp.), Mudd 1948, Welshimer i Robinow 1949.

Ziarna chromatynowe

Żadna część komórki bakteryjnej nie była przedmiotem tylu prac i tylu sporów. Nie wdając się tu w omawianie dawniejszych teorii i poglądów, które zostały dokładnie przedstawione w przeglądowych pracach Lewisa (1941), Knaysiego (1946 c) i Robinowa (1947), przedyskutujemy samą technikę badania.

W badaniach tego rodzaju największe uznanie zyskała metoda Feulgena (1924), opierająca się na stosowaniu odbarwionej przez zredukowanie zasadowej fuksyny. Przy hydrolizie kwasem solnym kwasów dezoksyrybozonukleinowych uwalnia się grupa aldehydowa dezoksyrybozy, wchodzącej w ich skład. Grupa aldehydowa działa utleniająco na zredukowaną fuksynę, przywracając jej czerwony kolor.

Nie jest to więc właściwie swoista reakcja na kwas tymonukleinowy, lecz odczyn na jedną z grup chemicznych, wchodzących w skład tego związku. Należy jednak zaznaczyć, że zasadniczo wszystkie reakcje cytochemiczne są tylko odczynami na specjalne ugrupowania atomów, stanowiących część drobin badanych.

Swoistość reakcji Feulgena była z wielu stron poddawana krytyce. Tak na przykład Stedman i Stedman (1943, 1947) twierdzą, że hydroliza przy pomocy 1 n HCl prowadzi nie tylko do odszczerpienia zasad purynowych, lecz również działa depolimeryzująco na kwasy nukleinowe, które wskutek tego przechodzą do roztworu i wtórnie zostają

adsorbowane na różnych strukturach komórkowych, głównie na chromozomach. Doskonały przegląd zagadnienia depolimeryzacji kwasów nukleinowych pod wpływem kwasu solnego znajduje się w pracy *Danielli*'ego (1947) i *Catcheside*'a (1947).

Zastrzeżenia co do swoistości odczynu mają również *Taylor* (1942) i *Knaysi* (1946 a), którzy podkreślają rolę lipidów w reakcji. Według *Tobie*, 1942 (wg *Knaysi*'ego 1946 c) wynik odczynu zależy w dużej mierze od stopnia redukcji i przy zmniejszeniu ilości dodawanego siarczynu dodatnie wyniki otrzymuje się również z całym szeregiem pentoz i heksoz. *Carr* (1945) zwraca uwagę na zależność odczynu od stężenia jonów wodorowych.

Jednak mimo tak wielu zastrzeżeń, reakcja *Feulgena* w połączeniu z innymi metodami cytochemicznymi i badaniami morfologicznymi i genetycznymi, pozwala na identyfikację i lokalizację kwasu dezoksyrybozo-nukleinowego.

Potwierdzają te badania przeprowadzone przy pomocy odczynu dwufenylaminowego *Dieschego*, badania w jednorodnym świetle pozafioletowym *Casperssona* (1947 a, 1947 b), *Malmgrena* i *Hadena* (1947).

Metoda badań struktur chromatynowych przy pomocy preparatów enzymatycznych, wprowadzona przez *Herwerdena* 1913 (wg *Catcheside* 1947), a rozwinięta przez *Boivin* (wg *Dubos* 1947), *Frołowa*, *Vendrely*'ego i współpracowników (*Vendrely* i *Lipardy* 1946, *Tulasne* i *Vendrely* 1947, 1948), wywołała początkowo znaczny entuzjazm wśród cytologów.

W miarę poznawania problemu przekonano się, że zjawisko to jest dalekie od prostoty. Przede wszystkim zauważono, że brak działania ze strony enzymu może być wywołany nie tylko przez jego nieaktywność, lecz również skutek utrudnionego dostępu enzymu do podłoża (*Danielli* 1947). Ponadto stwierdzono, że otrzymywane preparaty enzymatyczne posiadają niejednolity skład - prócz depolimeraz znajdują się w nich również fosfatazy i enzymy proteolityczne. Do pewnego stopnia podobne wyniki można otrzymać przy pomocy lizozymu (*Caselli* 1947), jadu żmii (*Bouquet* 1948), surowicy krwi (*Brachet* 1947), a nawet bakteriofaga (*Quersin* 1948).

Technika otrzymywania enzymu jest dość skomplikowana (*Kunitz* i *Dubos*) a prostsze metody nie dają pewności co do składu otrzymanego preparatu. Autor otrzymywał enzym w sposób stosunkowo prosty, według przepisu *Pieszkowa* (1946). W tak sporządzonym wyciągu niewątpliwie prócz rybozonukleazy znajdowała się fosfataza i katepsyna (*Catcheside* 1947) i lizozym (*Caselli* 1947). Dlatego też

rola tej metody w identyfikacji ziarn chromatynowych nie jest w danym wypadku zbyt wielka. Nie mniej — ziarna nierozpuszczalne w preparacie enzymatycznym nie zawierają kwasu rybozo-nukleinowego. Jest to więc informacja negatywna — dowiadujemy się z niej czym ziarna nie mogą być, a niestety nadal nic nie mówi ona nam czym ziarna są.

Szeroko obecnie wykorzystywana w badaniach cytologicznych metoda Piekarskiego (1935) i Robinowa (1947) polega, jak to wykazali Vendrely i Lehoult (1946) i Vendrely i Lipardy (1946), na większej rozpuszczalności kwasu rybozo-nukleinowego niż kwasu dezoksy-rybozo-nukleinowego w ciepłym 1*N* HCl. Ponieważ protoplazma *Sporocytophaga* barwi się normalnie bardzo słabo — metodę tę można w danym wypadku uprościć. Bezpośrednie barwienie barwikiem Giemsa, bez uprzedniej hydrolizy kwasem solnym, daje równie dobre rezultaty jak po hydrolizie, podobnie jak to odnośnie starych, ubogich w rybozonukleiny, komórek bakterii właściwych wykazał Pieszkow (1945).

Metoda Robinowa jest właściwie ulepszoną i uproszczoną technicznie metodą Badiana.

O tym, że wykrywane przy pomocy powyższych metod, lub przy pomocy hematoksyliny, struktury mają charakter chromatyny, świadczy zgodność wyników wszystkich metod, łącznie z badaniami w świetle pozafiołkowym (Piekarski 1938, Caspersson 1947) i w mikroskopie elektronowym (Knaysi 1943, Foster i Leland 1945, Mudd 1948, Hiller 1949).

Jak, słusznie zresztą, zwraca uwagę Knaysi (1943 b), aby uznać jakąś strukturę wewnątrzkomórkową za jądro lub „nukleoid“, należy uprzednio uwzględnić szereg kryteriów, wśród których charakter nukleo-proteinowy badanych ciał jest warunkiem istotnym ale nie wystarczającym. Knaysi podkreśla szczególnie znaczenie obserwacji nad zachowaniem się badanych struktur w czasie wzrostu komórki, przy jej podziale, w stadium starzenia się i w okresie głodowania.

Dlatego też autor uważał za słuszne określenie danych struktur jako „nukleoidy“ tylko wówczas, o ile dawały pozytywną reakcję Feulgena przynajmniej w pewnym stadium rozwojowym komórki, barwiły się hematoksyliną i innymi barwikami jądrowymi, barwiły się Giemszą w metodzie Robinowa, nie rozpuszczały się w wyciągu enzymatycznym ze śledziony i w gorącej wodzie, nie zanikały w komórkach głodzonych. Jednocześnie uwzględniano przemiany tych struktur w przebiegu cyklu rozwojowego drobnoustroju.

Wydaje się, że kryterium stałości występowania, wysunięte przez Knaysiego, nie może być uznane za absolutnie słuszne. Kryterium

to jest słuszne wyłącznie względem jądra komórkowego wyższych organizmów, organu komórkowego o skomplikowanej budowie i czynnościach. Natomiast nie może mieć zastosowania do struktur euchromatynowych znajdujących się w jądrze i stanowiących tylko część jego. Jak wykazały liczne badania, między innymi Casperssona i jego szkoły i Paintera (1944), ilość substancji dezoksy-rybozo-nukleinowych w jądrze nie jest stała, lecz podlega bardzo silnym wahaniom, podobnie jak ich lokalizacja i morfologiczne zróżnicowanie. Caspersson stwierdził, że w pewnych stadiach rozwoju komórki jądro może dawać ujemną reakcję Feulgena, co bynajmniej nie przemawia za tym, że jądro przestało być jądrem. Bakterie nie posiadają prawdziwego jądra o złożonej budowie. Natomiast twory, które Piekarski nazwał nukleoidami, a które Badian (1930), Lindegren (1935, 1942, 1947), Neumann (1941), Pieszkow (1945, 1946) i Robinow (1947) uważają za odpowiednik chromozomu, występują u wszystkich badanych dotychczas bakterii, przynajmniej w pewnych stadiach rozwoju.

Nie rozpatrując tutaj znaczenia kwasów dezoksy-rybozo-nukleinowych w budowie chromozomów, poddawanego w wątpliwość przez Stedmanów (1947), oraz roli chromozomów w procesach przekazywania cech, umniejszanej obecnie na podstawie badań cytologicznych przez Jeffrey'a (1947) i genetycznych przez Łysenkę (1947), należy podkreślić, że za istnieniem nukleoidów u bakterii przemawiają również badania nad regresywnymi mutacjami wywoływanymi przez promienie Roentgena, promienie gamma i gaz musztardowy (Delbrueck, Luria 1941, 1947, Lea 1941, Devi i współpracownicy 1947, Buzzati-Traverso i współpracownicy 1948).

Inkluzje wewnątrzkomórkowe

Bez względu na to, czy wolutyna jest spolimeryzowanym związkiem metafosforanowo-białkowym, jak twierdzą Wiame (1946) i Lindegren (1947), czy też kompleksem w ten lub inny sposób związanym z rybozo-nukleinianami, jak uważa większość badaczy, identyfikacja jej nie napotyka na większe trudności. Ziarna barwiące się błękitem metylenowym Mayera, barwiące się przy pH niższym niż 4,0, nie odbarwiają się pod wpływem 1% H_2SO_4 , rozpuszczalne we wrzącej i gorącej wodzie, w alkaliach, w 5% H_2SO_4 , chloralhydracie, nierozpuszczalne w eterze, chloroformie i alkoholu, mogą być niewątpliwie uważane za wolutynę.

Identyfikacja tłuszczów nie następuje większych trudności i daje się osiągnąć przy pomocy Sudanu III i odpowiednich rozpuszczalników (Le-

wis 1941). Prócz stosowanej metody istnieje wiele innych, z których reakcja Hartmanna (1940) z Sudanem Black B w glikolu etylowym, Dietricha i Liebermanna (1902) z błękitem naftolowym, Eisenberga (1909) — zawieszania bakterii w odczynniku precypitującym (kwas pikrynowy, fenol, jodyna itd.) i następnym mieszanii z rozcieńczonym roztworem fuksyny — są uważane za czulsze. W obecnych badaniach autor nie miał możliwości zastosowania tych metod.

Wyniki badań

M o r f o l o g i a

1. Mikrocyty szczepów typowych są mniej więcej dokładnie kuliste, o średnicy 1 do 1,5 μ , zwykle ułożone w grupy dość gęsto, tak, że w obrazie mikroskopowym przypominają wyglądem plaster pszczeli (Tabl. XII, b, c, Tabl. XV, 1).

Mikrocyty szczepu N są znacznie mniejsze — do 1 μ średnicy — i z reguły ułożone są oddzielnie, tak że rozróżnienie tych szczepów nie napotyka na trudności (Tabl. XII, a, d).

Barwikiem Gie m s a mikrocyty barwią się w sposób dość charakterystyczny — na tle niebieskawego śluzu widoczne są ciemno-lila zarodniki o wyraźnie zarysowującym się konturze zewnętrznym i ciemnym ziarnie centralnym, otoczone jasno-fioletową błoną. Przy barwieniu wg metody G r a m a, błękitem metylenowym L o e f f l e r a, błękitem toluidynowym, erytrozyną, błona ta jest niewidoczna, natomiast wewnętrzna struktura mikrocyty przedstawia się podobnie jak przy barwieniu Gie m s a. Przy barwieniu metodą G r a m a zarodniki przyjmują kolor czerwono-fioletowy. Kwaśnym karminem, karminem alunowym M a y e r a i mucikarminem cała komórka barwi się na kolor jasno różowy o nieco ciemniejszym konturze zewnętrznym i środku. Przy barwieniu Dahlia-zieloną metylową mikrocyty przedstawiają się jako fioletowe kuleczki, otoczone lila błoną. W metodzie barwienia na zarodniki według M o e l l e r a mikrocyty odbarwiają się.

Mikrocyty szczepu N dają zupełnie odmienny obraz. Prawie we wszystkich metodach barwienia przedstawiają się jako puste krążki, o silnie zabarwionej, pierścieniowatej warstwie zewnętrznej (Tabl. XII, a). Natomiast przy zadziałaniu ciepłą fuksyną karbolową Z i e h l - N e e l s e n a, środki ich zabarwiają się zupełnie wyraźnie, tak że różnią się od mikrocyt szczepów typowych tylko swą wielkością (Tabl. XII, d). Również po hydrolizie przy pomocy 1 n HCl w ciągu 24 godzin lub 1 n HCl o temp. 40°C przez 1 godzinę barwik przenika do środka, barwiąc wyraźniej tylko środek komórki a odśrodkowe jej części bardzo słabo.

Podsumowując powyższe uwagi można opisać mikrocyсты szczepów typowych jako twory kuliste, otoczone błoną, źle barwiącą się barwnikami zasadowymi, pod wpływem barwika *Giemsa* przyjmującą kolor lila. Wewnątrz znajduje się jednorodna, niezbyt silnie barwiąca się protoplazma, której zewnętrzna warstwa, przylegająca do błony (błona cytoplazmatyczna?) wykazuje znacznie większe powinowactwo do barwników. W środku mikrocyсты umieszczone jest ziarno centralne (Tabl. XV, 1), silnie łamiące światło, o dużym powinowactwie do barwników anilinowych. Jest to właśnie, jak później zostanie wykazane, ziarno chromatynowe.

Mikrocyсты szczepu N, znacznie mniejsze i o odmiennym wzajemnym ułożeniu, opatrzone są błoną nie przepuszczającą barwników. Budowa wewnętrzna jest taka sama jak w szczepach typowych.

II. Dojrzałe komórki wegetatywne szczepów typowych występują pod postacią śrubowato lub falisto wygiętych, pałeczkowatych tworów, o końcach zaokrąglonych (Tabl. XIII, li-k, tabl. XV, 8). Długość ich waha się od 3 do 8 μ , grubość 0,5 do 0,7 μ . Komórki barwią się bardzo słabo barwnikami anilinowymi, nieco lepiej barwnikiem *Giemsa*, przyjmując kolor fioletowawy. Barwienie jest nierównomierne — w poprzek komórek występują silniej zabarwione pasy, zaś końcowe części komórek niemal zupełnie nie przyjmują barwnika.

Komórki wegetatywne szczepu N są nieco mniejsze; ich długość waha się od 3 do 5 μ , grubość 0,4 do 0,5 μ . Charakter barwienia się taki jak u szczepów typowych.

Pod względem morfologii szczepy badane odpowiadają w zupełności dotychczasowym opisom.

Błona komórkowa.

Błona mikrocyсты jest dość gruba (u szczepów typowych do 0,3 μ) barwnikami anilinowymi barwi się słabiej niż cytoplazma: stężoną fuksyną karbolową *Ziehl-Neelsen*a barwi się na kolor czerwony, barwnikiem *Giemsa* na kolor liliowy. Tak w metodzie *Gutsteina* przy bajcowaniu taniną, jak i w metodzie *Knaysi*ego, barwi się na kolor granatowy, podczas gdy cytoplazma przyjmuje barwę jasno purpurowo-fioletową (Tabl. XII, a, b; tabl. XV, 1). Kontury błony na preparatach barwionych są ostre. Karminem barwi się nieco silniej niż cytoplazma, podobnie jak barwnikiem *Giemsa* lub zielenią metylową po uprzedniej hydrolizie kwasem solnym. Odczynnik *Lugola* barwi ją na kolor jasno żółty. Reakcje na błonnik, białko i tłuszcze — ujemne. Błona jest dość przepuszczalna dla barwników, ale sama łączy się z nimi bardzo słabo.

Przepuszcza również kwasy, zasady i rozpuszczalniki tłuszczowe (alkohol, aceton, chloroform, eter), jak o tym świadczy odbarwianie się mikrocyst pod wpływem tych odczynników. Gotowanie nie powoduje rozkładu błony i nie zmienia jej zachowania się w stosunku do odczynnika *Lugola*.

U szczepu N błona jest znacznie cieńsza, jak to wykazują bardzo wyraźnie preparaty barwione metodą *Gutsteina*; jest jednak bezporównania mniej przepuszczalna dla barwików niż błona mikrocyst typowych. Natomiast przepuszczalność dla rozpuszczalników tłuszczowych jest niemal taka sama.

W komórkach wegetatywnych nie udało się stwierdzić obecności błony komórkowej ani przy pomocy metody *Gutsteina* ani *Knaysi*-ego. Również nie zostały uwieńczone sukcesem próby splazmolizowania komórki i odciągnięcia cytoplazmy. Jedynie przy zastosowaniu zmodyfikowanej metody *Vahle'go* (działanie tanina, chlor-cynk-jodem i barwienie fioletem kryształowym) można było uwidocznić nieco silniej zabarwione kontury zewnętrzne komórki. Trudno jest w tym stadium badań zdecydować, czy mamy do czynienia w tym wypadku rzeczywiście z barwieniem błony, czy też z adsorpcją barwika i odczynników na powierzchni nieosłoniętej komórki.

Ziarno chromatynowe (Nukleoid).

W mikrocycie w stanie spoczynkowym, centralne, silnie łamiące światło ziarno barwi się silniej niż protoplazma barwnikami anilinowymi (Tabl. XV, 1). Ziarno to daje dodatnią reakcję *Feulgen*a, barwi się w metodzie *Robinowa*, w metodzie rybozonukleazowej i hematoksyliną *DeLafielda*. Należy jednak zaznaczyć, że w wymienionych metodach barwienia struktur jądrowych ziarno jest znacznie mniejsze niż przy barwieniu barwnikami anilinowymi, natomiast kontury ziarna są ostrzej zarysowane. Ziarno to nie ginie po hydrolizie kwasem solnym, po działaniu wrzącej wody i innych rozpuszczalników wolutyny lub rozpuszczalników tłuszczowych (bakterie poddawano działaniu danych rozpuszczalników a następnie barwiono je odpowiednimi metodami). Uwzględniając zachowanie się tego ziarna w cyklu rozwojowym (patrz niżej) autor uważa się za usprawiedliwionego w zidentyfikowaniu tego tworu jako chromatyny i przyjęciu dlań nazwy nukleoid, proponowanej przez *Piekar*skiego dla „jąder” bakteryjnych.

U form wegetatywnych nie udało się wykazać obecności centralnego ziarna. Natomiast występują tam poprzeczne pasy w ilości 3 do 8, a wyjątkowo nawet 10. Pasy te nie posiadają ostro zarysowanych granic,

lecz stopniowo przechodzą w słabiej barwiącą się protoplazmę. Poprzeczne pasy barwią się barwnikami chromatynowymi (hematoksylina, barwik Giemsa, zieleń metylowa) znacznie silniej niż protoplazma. W metodzie Feulgena ani wspomniane pasy ani też inne części komórki nie barwią się. Brak więc w tym momencie dowodu, że pasy są zbudowane z substancji dezoksynukleoproteinowej. Losy ich w czasie formowania i kielkowania mikrocyst świadczą jednak o bliskim związku jaki istnieje między nimi a ziarnem chromatynowym mikrocysty.

W trąty wewnątrzkomórkowe.

Ani w mikrocystach ani w komórkach wegetatywnych nie udało się stwierdzić obecności tłuszczu, glikogenu, jogenu — czy to w postaci ziarn czy też w stanie rozproszonym.

Natomiast zauważono, że pewne zagęszczenia w protoplazmie zachowują się jak wolutyna (barwienie błękitem metylenowym, rozpuszczalność w wrzącej wodzie, 1% kwasie siarkowym, 0.02% kwaśnym węglanie sodu, 10% kwasie solnym itd). W stadium wegetatywnym zagęszczenia takie obserwowano tylko w komórkach młodych, przy czym często maskowały one zupełnie wspomniane wyżej pasy chromatynowe. Natomiast w mikrocystach wolutyna występowała w stosunkowo dużych ilościach, również jednak nie tworząc morfologicznie zróżnicowanych tworów. Występowała ona w postaci silnego zagęszczenia w środkowych partiach mikrocysty wokół nukleoidu.

W starych komórkach protoplazma jest mniej jednorodna; nigdy jednak nie udało się stwierdzić obecności wodniczek lub zwyrodnienia w postaci przetłuszczenia.

Podział komórki.

Podział komórki następuje przez przewężenie bez uprzedniego odkładania zaczątków przegrody lub odciągania protoplazmy.

Pierwszy podział ma miejsce, gdy komórka kielkująca z mikrocysty jest jeszcze stosunkowo krótka i posiada kształt cylindryczny. Dalsze podziały następują we wszelkich stadiach wzrostowych komórki, tak że jakiegokolwiek zależności pomiędzy podziałem a wzajemnym stosunkiem powierzchni i objętości komórki nie można stwierdzić. Przemawiałoby to za „wielojądrowością“ *Sporocytophaga*, podobnie jak ma to miejsce u laseczek i maczugowców (K n a y s i 1941).

Cykl rozwojowy.

W niedługi czas po przeniesieniu mikrocyst na nową pożywkę (po półtora do trzech godzin) rozpoczynają one kiełkować. Początkowo kiełkuje tylko nieznaczna część zarodników, dopiero stopniowo i znacznie później proces ten obejmuje wszystkie. Pierwsze stadium kiełkowania przebiega zawsze mniej więcej jednakowo (Tabl. XIII, Tabl. XV, 2—5, 7). Kontury błony stają się mniej widoczne, błona barwi się słabiej. Jednocześnie w ziarnie centralnym widoczna staje się mała silnie łamiąca światło granula. Czy granula ta stanowi odrębną strukturę, czy też jest tylko zmienionym nukleoidem nie można obecnie zdecydować.

Losy kiełkujących mikrocyst są w stadiach późniejszych niejednolite — kiełkowanie odbywa się według dwóch typów (Tabl. XIII, b-g, b₁-g₁).

W typie pierwszym, spotykanym najczęściej, błona ulega stopniowej choć niezupełnej autolizie, kontury jej stają się coraz mniej ostre, barwi się coraz słabiej, tak że wreszcie wszelkie rozróżnianie błony i protoplazmy staje się niemal niemożliwe (Tabl. XIII, b). Nukleoid ulega niewielkiemu przemieszczeniu, układając się nieco ekscentrycznie, a następnie wydłuża się przyjmując formę krótkiej pałeczki. Na powierzchni mikrocysty pojawia się rodzaj uwypuklenia. W tym miejscu zarys błony jest najmniej wyraźny (Tabl. XIII, c). Uwypuklenie to tworzy z czasem pałeczkowatą wypustkę, często haczykowato wygiętą. Mikrocysta przyjmuje w ten sposób kształt gruszkowaty, buławkowaty lub haczykowaty (Tabl. XIII, d', e', d'', e''). W miarę wzrostu wypustki, któremu towarzyszy wydłużanie i spłaszczanie się mikrocysty, nukleoid przybiera postać dość długiej pałeczki, częstokroć z przewężeniem w środku (kształt biszkoptowaty). Taka wrzecionowato-jajowata lub gruszkowata komórka wysuwa się z błony mikrocysty, która zarysowuje się jako ledwo widoczny cień przy grubszym końcu komórki (Tabl. XIII, e' e''). W wielu wypadkach resztką błony w ogóle nie daje się zauważyć, czy to wskutek zbyt daleko posuniętej lizy, czy też z powodu drobnych jej rozmiarów i wynikających stąd trudności spostrzeżenia jej.

Przewężający się w środku nukleoid dzieli się na dwa pochodne ziarna, mniej więcej w momencie gdy młoda komórka ma około 3 μ długości. Wkrótce po tym następuje pierwszy podział komórki, przy czym niekiedy nukleoid w jednej z pochodnych komórek przybiera kształt biszkoptowaty. Komórka wydłuża się następnie, jednocześnie zwężając się i przybiera formę banana lub bumeranga (Tabl. XIII, g, h). W trakcie tych przemian znika stopniowo zróżnicowanie na błonę i protoplazmę, a jednocześnie protoplazma barwi się coraz słabiej. Ziarno chromatynowe powiększa się i ulega dalszym podziałom, którym często nie towarzyszy

podział komórki, tak że w dojrzałych komórkach występuje parę nukleoidów. Nukleoidy te tracą swój ziarnisty kształt i zamieniają się w poprzeczne pasy, tak charakterystyczne dla form wegetatywnych.

Przy podziale komórki wegetatywnej nie stwierdza się żadnych zmian w strukturze lub formie pasów. Podział jednak przebiega zawsze w ten sposób, że przewężenie powstaje w miejscu leżącym pomiędzy dwoma pasami.

Drugi typ kiełkowania mikrocyst przedstawia się zupełnie odmiennie i spotyka się bez porównania rzadziej. Nukleoid ulega tu podziałowi jeszcze w mikrocycie, prawie niezmienionej poza zaczynającym się już zanikiem błony i słabszym barwieniem się protoplazmy (Tabl. XIII, b₁). Dzieliące się ziarno chromatynowe układa się ekscentrycznie, a potem dopiero pojawia się uwypuklenie na mikrocycie, do którego wędruje jedno z pochodnych ziarn chromatynowych (Tabl. XIII, d₁). Drugi, siostrzany nukleoid przesuwają się na przeciwny brzeg mikrocysty, niemal do samej błony. Przemianom tym towarzyszy zanik konturów błony i bardziej jednolite i słabsze barwienie się całej komórki, mającej wówczas zwykle kształt gruszki. Uwypuklenie, podobnie jak w pierwszym typie kiełkowania, wydłuża się a pozostałość mikrocysty jednocześnie ulega stopniowemu zanikowi. Przy obserwowaniu tego zjawiska odbiera się wrażenie jakby wywędrowywania zawartości mikrocysty do uwypuklenia.

Ziarno chromatynowe, które przeszło do uwypuklenia, ulega dalszemu podziałowi, natomiast drugie, umieszczone przy przeciwnym brzegu mikrocysty, zostaje jakby rozpuszczone, maleje i rozplywa się w cytoplazmie (Tabl. XIII, e₁). Dalsze przemiany są identyczne ze spotykanymi w pierwszym typie kiełkowania, tak że ostatecznie otrzymuje się komórki wegetatywne niczym nie różniące się między sobą.

Proces powstawania mikrocyst przebiega również dość skomplikowanie (Tabl. XIV). W okresie przed tworzeniem mikrocysty komórki wykazują zmniejszoną ilość pasów chromatynowych (Tabl. XIV, b). Czy jest to wynikiem wielu kolejnych podziałów komórki, którym nie towarzyszy podział substancji chromatynowej, czy też zanikania części pasów lub ich wzajemnego łączenia się — nie udało się stwierdzić z pewnością. Obserwacje tego procesu są tym trudniejsze, że pasy zagęszczenia chromatyny w starych komórkach barwią się jeszcze słabiej niż i tak niezbyt silnie adsorbujące barwik pasy komórek młodych. Dotychczasowe spostrzeżenia przemawiają raczej za tym, że redukcja ilości pasów następuje wskutek ich zaniku.

Komórka wegetatywna ulega skróceniu i zgrubieniu, przybierając kolejno kształt pałeczki, elipsoidu i jajka. Taka elipsoidalna komórka

posiada dwa pasy chromatynowe, zwykle umieszczone blisko obok siebie, mniej więcej w środku komórki (Tabl. XIV, d). W następnym stadium, gdy komórka przybiera kształt jajowaty lub wrzecionowaty, pasy te łączą się wskutek czego powstaje równikowa blaszka poprzeczna, barwiąca się intensywniej niż pasy chromatynowe komórek wegetatywnych. (Tabl. XIV, e).

Ta równikowa blaszka chromatynowa przesuwą się do jednego z biegunów komórki (Tabl. XIV, f), a jednocześnie w miarę zaokrąglania się pramikrocysty przyjmuje kształt owalny. W ten sposób w pramikrocycie widoczne jest jedno, owalne i dość silnie barwiące się ziarno chromatynowe, położone biegunowo (Tabl. XIV, g, h, i).

Zmianom powyższym towarzyszy zwiększanie zdolności barwienia się cytoplazmy tak, że z czasem cała pramikrocysta barwi się prawie jednolicie, z ostrzej zarysowującym się ziarnem centralnym i brzegową strefą zagęszczenia, z której następnie powstanie błona. Chromatyna zbija się coraz silniej i przesuwa się jednocześnie ku środkowi zaokrąglającej się mikrocysty. Błona grubieje, aż wreszcie tworzy się zarodnik, który przyjęliśmy za punkt wyjściowy przy rozpatrywaniu cyklu rozwojowego.

Wyjątkowo spotykano formy, których znaczenie nie jest jasne, a które można by było interpretować jako zupełnie odmienny sposób rozmnażania. Są to mianowicie komórki nieco większe niż młode, wrzecionowate komórki kielkujące, o protoplazmie zupełnie homogennej i prawie zupełnie nie barwiącej się, posiadające dwa ziarna chromatynowe, ostro odcinające się od reszty cytoplazmy (Tabl. XII, e).

W obrazach mikroskopowych widoczne są w preparatach utrwalonych i barwionych komórki w ułożeniu nasuwającym podejrzenie łączenia się ich. Ponadto obserwuje się podobne komórki, tylko nieco większe i bardziej zaokrąglone, o czterech lub ośmiu ziarnach chromatynowych. Protoplasma ich jest nadal jednorodna, a błona komórkowa bardzo cienka. Jak już wspomniano formy takie spotykano tylko wyjątkowo. Na wiele set preparatów przejrzanych zauważono je zaledwie parokrotnie. Dalszych losów tych komórek nie udało się prześledzić.

Rozgałęzione komórki wegetatywne spotykano w starych hodowlach. Mają one kształt litery Y lub widełek. Nigdy nie stwierdzono, aby takie komórki tworzyły mikrocysty, a również aby ulegały podziałowi. Przypuszczalnie uważać je należy raczej za formy inwolucyjne, niezdolne do dalszego rozwoju.

W starszych hodowlach obserwowano również charakterystyczne ułożenie komórek wegetatywnych w formie kwiatostanu astra lub chryzantemy (Tabl. XII, f). Podobne „gwiazdziste“ ułożenie komórek opisali

Stapp i Bortels. Nasuwa się podejrzenie, czy nie mamy w tym wypadku do czynienia z zaczątkowym (lub szczątkowym) przejawem „płciowego komunizmu“ (reproductive communalism). Wyjaśnienia tego ciekawego problemu należy szukać w dalszych badaniach nad mechanizmem powstawania ciał owocujących u bakterii śluzowych.

Dyskusja wyników

Morfologia badanych szczepów nie odbiega zasadniczo od opisów spotykanych w literaturze. Natomiast dane dotyczące wewnętrznej budowy komórki i przebiegu cyklu rozwojowego zdają się wskazywać, że różnica pomiędzy *Sporocytophaga* a pozostałymi myksobakteriami jest znacznie iniejsza niż by to wynikało z wielu dotychczasowych prac.

Przed wszystkim zewnętrzna warstwa ciała komórkowego (błona?) daje się uwidocznic przy pomocy łącznego działania chlor - cynk - jodu i barwika anilinowego. Przy pomocy podobnej metody Vahle (1909) zademonstrował błonę u bakterii śluzowych. Błona mikrocystry jest natomiast doskonale wykształcona w postaci grubej, prawdopodobnie wielowarstwowej osłony, stosunkowo słabo przyjmującej barwiki. Jej przepuszczalność dla odczynników nie jest niezmienna, lecz waha się zależnie od typu drobnoustrojów. W badanym „szczepie N“ błona mikrocystry jest wyjątkowo mało przepuszczalna dla roztworów barwików, tak że przy zwykłych metodach barwienia mikrocystry wyglądały jak puste w środku krążki.

Przypuszczalnie małą przepuszczalnością błony mikrocystry dla barwików można by było wytłumaczyć obserwowane przez Imszenieckiego „puste mikrocystry“ u *Myxococcus ellipsosporus* (*Sporocytophaga ellipsospora*).

Wśród badaczy, zajmujących się problemem występowania chromatyny u *Sporocytophaga*, zarysowały się dwa zasadnicze kierunki. Według pierwszego kierunku, reprezentowanego przez Imszenieckiego i jego szkołę, komórka wegetatywna *Cytophaga* i *Sporocytophaga* nie posiada zróżnicowanego morfologicznie nukleoidu, odróżniając się tym od wszystkich pozostałych przedstawicieli *Myxobacteriae*. Podobne stanowisko zajmuje Krzemieniewska. Druga grupa badaczy uważa, że u *Sporocytophaga* istnieje centralne ziarno chromatynowe: opisuje je Winogradsky, Tchani, Pochon i Prévot i Tchani i Giuntini (1948). Natomiast wg Staniera chromatyna u młodych komórek wegetatywnych występuje w stanie rozproszonym, a w starych w postaci jednolitego ziarna. Podobny opis substancji chromatynowej u *Myxococcus* dał Milovidov (1935).

Według obecnych informacji, nukleoid występuje zupełnie wyraźnie w mikrocytach, przy czym autor nie zauważył aby cała mikrocyta dawała kiedykolwiek dodatnią reakcję Feulgena, jak to spostrzegał Beebe u *Myxococcus xanthus*. W komórkach wegetatywnych chromatyna występuje w postaci paru skupień, jednak pozbawionych ostrych konturów odgraniczających je od protoplazmy. Skupienia te przybierają postać poprzecznych pasów o dyfuzyjnym typie barwienia, nie dających dodatniej reakcji Feulgena. Nie udało się wykazać obecności dezoksyrybozo-nukleinowego kwasu w tych tworach; na podstawie reakcji cytochemicznych wykluczono ich rybozo-nukleinową lub wolutynową naturę. Jednocześnie na podstawie badań nad cyklem rozwojowym ustalono ich genetyczny związek z nukleoidem mikrocyty. Nie wykluczone zatem, że w formach wegetatywnych nagi chromozom albo nukleoid zawiera tak nieznaczne ilości kwasu tymonukleinowego, że nie daje się on wykazać przy pomocy stosowanych metod.

Podobnie uformowane poprzeczne pasy opisuje Imszeniecki u myksobakterii właściwych, przypisując im rolę i budowę nukleoidu. Również u Vahl'e'go znajdujemy identyczne obrazy ciał jądrowych u przedstawicieli *Myxobacteriae*.

Kielkowanie mikrocyt odbywa się zasadniczo przez odrzucanie resztek błony i wypełzanie kielkującej komórki, podobnie jak to opisywali Krzemieniewska i Stanier. Obserwacje Izaczénki i Wakenguta, według których w dojrzałej mikrocyście miała spoczywać spiralnie skręcona młoda komórka, polegają niewątpliwie na nieporozumieniu. Złudzenie powstało prawdopodobnie wskutek obecności w kielkującej mikrocyście silnie łamiącego światło ziarna centralnego.

Nie udało się również potwierdzić spostrzeżeń Stappa i Bortelsa (1934) i Imszenieckiego i Sołncewy (1936), zgodnie z którymi kielkująca komórka pozostawiałaby rodzaj ziarna jako resztkę mikrocyty.

W cyklu rozwojowym właściwych bakterii śluzowych stwierdzono przemianę pokoleń (haploid — diploid) i autogamię (Beebe 1941, Badian 1930, 1933). Większość autorów badających *Sporocytophaga* i *Cytophaga*, stwierdza, że nigdy nie zauważyli żadnej formy rozrodu płciowego. Jedynie Stapp i Bortels opisywali łączenie się komórek wegetatywnych przed tworzeniem mikrocyt.

Podobny obraz otrzymał autor (Tabl. XII, e) — łączenia się komórek wegetatywnych, jednak nie przed tworzeniem mikrocyt, a bezpośrednio po kielkowaniu, u młodych form. Ze względu na duże luki w tych obserwacjach i na niemożność prześledzenia losów „kopulujących“ komórek w preparatach pod szkiełkiem, co zresztą odnosi się również do spostrze-

zeń Stappa i Bortelsa, autor uważa za celowe wstrzymanie się od jakiegokolwiek interpretacji.

Na haczną uwagę zasługuje natomiast, zdaniem autora, II typ kielkowania opisany w obecnej pracy (Tabl. XIII). Mamy tu do czynienia niewątpliwie z podziałem redukcyjnym — z powstających w kielkującej mikrocyście nukleoidów tylko jeden przechodzi do nowej komórki, drugi ulega wchłonięciu i zanika.

Oczywiście, o ile przyjmiemy istnienie podziału redukcyjnego przy kielkowaniu mikrocystry, musimy przypuścić, iż u *Sporocytophaga* ma miejsce jakiś proces płciowego rozmnażania się — autogamia lub izogamia w trakcie tworzenia mikrocystry lub w fazie wegetatywnej. Otóż podobnych przemian nukleoidu, które dałyby się bezspornie interpretować jako auto- lub izogamia nie spostrzeżono.

Należy jednak pamiętać, że podobna luka znachodzi się w badaniach Beebe'ego nad autogamią u *Myxococcus xanthus*, gdzie również nie udało się bezpośrednio zaobserwować łączenia się jąder, a tylko pośrednio wnioskuje się o tym zjawisku ze zmniejszonej ilości nukleoidów w kielkującej mikrocyście.

Proces łączenia się pasów chromatynowych, tworzenia równikowego pasa chromatynowego, z którego powstaje później nukleoid mikrocystry, przy bliższej analizie nasuwa możliwość występowania autogamii również u *Sporocytophaga* (Tabl. XIV). Proces ten ze względów technicznych nie nadaje się do obserwacji przy pomocy stosowanych metod i wymagałby dalszych, dokładniejszych badań przy pomocy doskonalszej techniki (analiza w promieniach pozafioletkowych, mikroskop elektronowy).

W każdym bądź razie, wobec stwierdzenia podziału redukcyjnego, mamy pełne prawo wnioskować, podobnie jak to uczynił Beebe odnośnie *Myxococcus*, o obecności autogamii u *Sporocytophaga*.

W świetle tych obserwacji autor skłonny jest twierdzić, że cykl rozwojowy *Sporocytophaga* zasadniczo nie różni się niczym od cyklu rozwojowego innych bakterii śluzowych, poza brakiem zdolności do tworzenia cyst i owocni.

Mechanizm owocowania u bakterii śluzowych jest zupełnie niewyjaśniony. W każdym bądź razie wiadomo z badań Śnieszki (1942, wg Staniera), że tworzenie owocni uzależnione jest, przynajmniej niekiedy, od pewnych substancji, których bakterie śluzowe nie są w stanie same wytworzyć (badane przez Śnieszkę bakterie śluzowe tworzyły owocnie tylko wtedy, gdy rosły uprzednio na hodowli innych bakterii, stanowiących ich pożywkę). Analogiczny wniosek można wyciągnąć z prac Miszustina (1942) nad wpływem substancji wzrostowych na owocowanie u *Chondrococcus coralloides*.

Sporocytophaga pod względem fizjologicznym jest organizmem bardzo wyspecjalizowanym (Stanier 1942, Fahraeus 1947). Możliwe więc, że brak owocowania da się wytłumaczyć nie jako wcześniejszy etap w rozwoju, lecz jako przejaw rozwoju regresywnego. W związku z tym szczególnie ciekawe byłoby zbadanie znaczenia i przyczyn pojawiania się gwiaździstego ułożenia komórek w hodowlach *Sporocytophaga*.

W świetle obecnych badań zanika również sztuczna granica, wzniesiona przez Imszenieckiego i jego szkołę, między *Sporocytophaga* a pozostałymi bakteriami śluzowymi, a oparta na rozróżnianiu dyfuzyjnego jądra u pierwszych i morfologicznie zróżnicowanego u drugich.

Wobec powyższych wniosków, za najbardziej celową i naturalną klasyfikację należałoby uznać klasyfikację proponowaną przez Staniera (1941), uwzględniającą bliskie pokrewieństwo między *Sporocytophaga* i *Myxococcales*. Tworzenie nowych rzędów, obejmujących *Cytophaga* i *Sporocytophaga*, często łącznie z zupełnie odmiennymi drobnoustrojami (rząd *Promyxobacteriales* Imszenieckiego i Krasilnikowa (1948), obejmujący dodatkowo rodzaj *Promyxobacterium* lub rząd *Flexibacteriales* Soriano (1945), w którym połączono *Flexibacter*, *Cytophaga* i... *Beggiatoa*) wydaje się zupełnie zbyteczne. Tchan, Pochon i Prévot zaproponowali utworzenie nowego rzędu — *Asporangiales* — obejmującego tylko dwa rodzaje — *Cytophaga* i *Sporocytophaga*. Wobec zbliżonego przebiegu cyklu rozwojowego, wydawałoby się słusznym podkreślić w klasyfikacji stosunkowo bliskie pokrewieństwo *Myxococcales* i *Sporocytophaga* przez włączenie *Cytophaga* i *Sporocytophaga* do tego rzędu, jako osobny podrząd *Asporangiales* z jedną rodziną *Cytophagaceae*.

PIŚMIENNICTWO

1. Badian J. — 1930, *Acta Soc. Botan. Polon.*, 7: 55.
2. Badian J. — 1933, *ibidem*, 10: 361.
3. Beebe J. M. — 1941, *Journ. Bacter.*, 42: 193.
4. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1948.
5. Bouquet P. et Lehout Y. — *Annal. Institut. Pasteur*, 1948. 74; 339.
6. Brachet J. — 1947, *Symposium Soc. Exp. Biol.*, Cambridge, 1947; 207.
7. Buzzati-Traverso A., Visconti di Modrone N. et Cavalli L. L. — 1948, *Nature (Lond.)*, 162; 295.
8. Carr J. G. — 1945, *Nature (Lond.)*, 156; 143.
9. Caspersson T. — 1947, *Symposium Soc. Exp. Biol.*, Cambr., 1947; 27.
10. Caselli P. — 1947, *Bolletino Soc. Italiana Biol. Sperim.*, 23; 1176.
11. Catcheside D. G. and Holmes B. — 1947, *Symposium Soc. Exp. Biol.* Cambridge, 1947; 225.
12. Clark F. E. a. Mitchell R. B. — 1942, *Journ. Bacter.*, 44; 529.
13. Danielli J. F. — 1947, *Symposium Soc. Exp. Biol.* Cambr., 1947; 101.
14. Delbrück M. — 1948, *Journ. Bact.*, 56; 1.
15. Devi P., Pontocorvo G. a. Higginbottom C. — 1947, *Nature (Lond.)*, 160; 503.
16. Dubos R. J. — *The bacterial cell*, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1947.
17. Eisenberg P. — 1910, *Zbl. f. Bakter.*, I. Orig., 53; 181.
18. Fahraeus G. — 1947, *Symbol. Botan. Upsal.*, 9; 2.
19. Foster R. A. a. Leland L. A. — 1945, *Journ. Bacter.*, 51; 584.
20. Feulgen R. u. Rosenbeck H. — 1924, wg Lengeron, M., *Precis de Microscopie*, Masson et Cie, Paris, 1942.
21. Gutstein M. — 1924, *Zbl. f. Bakter.*, I. Orig., 93; 233.
22. Gutstein M. — 1925, *ibidem*, 94; 145.
23. Gutstein M. — 1925, *ibidem*, 94; 393.
24. Hiller J., Mudd S. a. Smith A. G. — 1949, *Journ. Bacter.*, 57; 319.
25. Hutchinson and Clayton — wg Krzemieniewska H. (1930).
26. Imszeniecki A. A. i Solncewa L. I. — 1936, *Doklady Akad. Nauk SSSR, Seria Biol.*, 1936; 1115.
27. Imszeniecki A. A. — 1945, *Mikrobiologia*, 14/2; 64.
28. Imszeniecki A. A. i Solncewa L. I. — 1945 *ibidem*, 14/4; 220.
29. Imszeniecki A. A. — 1949, *ibidem*, 18/5; 393.
30. Izaczenko i Wakengut — wg Stanier (1942).
31. Jahn — wg Stanier (1942) i Knaysi (1946 b).
32. Jeffrey E. C. — 1947, *Science*, 106; 305.
33. Klieneberger — Nobel E. — 1947, *Journ. Gen. Microbiol.*, 1: 33, wg *Biol. Abstr.*
34. Knaysi G. — 1941, *Journ. Bacter.*, 41; 141.
35. Knaysi G. — 1942, *ibidem*, 43; 365.
36. Knaysi G. — 1943 a, *ibidem*, 46; 451.
37. Knaysi G. a. Mudd S. — 1943 b, *ibidem*, 45; 349.
38. Knaysi G. — 1946 a, *ibidem*, 51; 113.
39. Knaysi G. — 1946 b, *Elements of Bacterial Cytology*, Ithaca, 1946.
40. Knaysi G. — 1946 c, *Journ. Bacter.*, 51; 177.

41. Krasilnikow N. A. — 1948, *Mikrobiologia*, 17/2; 105.
 42. Krzemiewski H. i S. — 1928, *Acta Soc. Botan. Polon.*, 6; 46.
 43. Krzemiewska H. — 1930, *ibidem*, 7; 507.
 44. Krzemiewska H. — 1933, *Archiv. f. Mikrobiol.*, 4; 394.
 45. Kunicki—Goldfinger Wl. — 1949, *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, 1/3; 383.
 46. Lea D. — 1946, *Brit. Medic. Bull.*, 4; 24.
 47. Lewis J. M. — 1941, *Bacter. Rev.*, 5; 181.
 48. Lindegren C. C. — 1935, *Zbl. f. Bakter., II, Orig.*, 92; 40.
 49. Lindegren C. C. — 1942, *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 16; 307 wg *Vet. Bull.*, 1947, 1947, 17; 12, entry 59.
 50. Lindegren C. C. — 1947, *Nature (Lond.)*, 160; 63.
 51. Łysenko T. D. — *Agrobiologia*, Moskwa, 1948.
 52. Malmgren B. a. Haden C. G. — 1947, *Nature (Lond.)*, 159; 577.
 53. Miszustin E. — 1942, *Mikrobiologia*, 11/4.
 54. Mudd S. — 1948, *Nature (Lond.)*, 161; 302.
 55. Neumann F. — 1941, *Zbl. f. Bakter., II, Orig.*, 103; 385.
 56. Nicolosi G. — 1947, *Bollet. d. Soc. Italiana Biol. Sperim.*, 23/6; 620.
 57. Omeliański W. L. — *Prakticzeskoje rukowodztwo po mikrobiologii*. Moskwa, 1940.
 58. Painter T. S. — 1944, *Texas Rep. on Biol. a. Med.*, 2; 206.
 59. Piekarski G. — 1937, *Archiv. f. Mikrobiol.*, 8; 428.
 60. Piekarski G. — 1940, wg *Zbl. f. Bakter., I, Ref.*, 136; 8.
 61. Pieszkow M. A. — 1945, *Żurnal Mikrob., Epidemiol. Inmunol.*, 4—5; 10.
 62. Pieszkow M. A. — 1946, *Mikrobiologia*, 15/4; 341.
 63. Pieszkow M. A. (Peshkoff). *Nature (Lond.)*, 1946, 157; 137.
 64. Quersin L. — 1948, *Annal. Institut. Pasteur*, 75; 522.
 65. Robinow C. F. — 1947, *Addendum do: Dubos R. J.: The Bacterial Cell*.
 66. Sołncewa A. — 1941, *Mikrobiologia*, 10/5; 505.
 67. Soriano wg Tchan, Pochon e. Prévot 1948.
 68. Stanier R. Y. — 1942, *Bacter. Rev.*, 6; 143.
 69. Stapp u. Bortels — *Zbl. f. Bakter. II, Orig.*, 90; 20.
 70. Stedman E. a. Stedman E. — 1943, *Nature (London)*, 152; 267.
 71. Stedman E. a. Stedman E. — 1947, *Symposium Soc. Exp. Biol. Cambridge, 1947*; 232.
 72. Taxter wg Knaysi 1946 b.
 73. Taylor A. R. et al. — 1942, *Journ. Inf. Dis.*, 71; 110.
 74. Tchan Y. T., Pochon J. et Prévot A. R. — 1948, *Annales Institut. Pasteur*, 74; 394.
 75. Tchan et Guintini wg Nr. 74.
 76. Tulasne R. et Vendrely R. — 1947, *Nature (Lond.)*, 160; 225.
 77. Tulasne R. et Vendrely R. — 1948, *ibidem*, 161; 317.
 78. Vahle C. — 1909, *Zbl. f. Bakter., II, Orig.*, 25; 178.
 79. Vendrely R. et Lehault C. — 1946, *C. R. Acad. Sci.*, 222; 1357, wg Nr 77.
 80. Welshimer H. J. a. Robinow C. F. — 1949, *Journ. Bacter.*, 57; 489.
 81. Wiame — 1946, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, wg Meisel M. N. *Mikrobiologia*, 1949, 18/3; 263.
 82. Winogradsky S. — 1949, *Annal. Institut. Pasteur*, 43; 349.
-

OBJAŚNIENIE TABLIC — EXPLANATION OF PLATES

Tablica XII. — Plate XII.

- a — Szczep N — mikrocyty, barwione metodą Gutsteina.
Strain N — microcysts, stained by Gutstein's technique.
- b — *Sp. myxococcoides*, mikrocyty barwione metodą Gutsteina.
Sp. myxococcoides, microcysts, stained by Gutstein's technique.
- c — *Sp. myxococcoides*, mikrocyty, barwione barw. Giemsa.
Sp. myxococcoides, microcysts, stained with Giemsa solution.
- d — Szczep N, mikrocyty, barwione fuksyną karbolową Ziehl-Neelsena.
Strain N, microcysts, stained with Ziehl-Neelsen's carbol fuchsin.
- e — Niezwykłe formy komórek, o nieznanym pochodzeniu i roli, w starych hodowlach *Sporocytophaga*.
Unusual forms in old cultures of *Sporocytophaga*.
- f — Gwieździste ułożenie komórek w starej hodowli *Sporocytophaga*.
„Star” formation in old culture of *Sporocytophaga*.

Tablica XIII. — Plate XIII.

- Cykl rozwojowy *Sp. myxococcoides*. A. Kielkowanie mikrocyt.
Reconstruction of the life-cycle of *Sp. myxococcoides*. A. Microcysts germination.
- I (a — g) — Pierwszy typ kielkowania — The first type of germination.
- II (a — g₁) — Drugi typ kielkowania — The second type of germination.
- a — dojrzała mikrocyta — mature microcyst.
- b₁ — d₁ — redukcja chromatyny — chromatin reduction.
- h — k — komórki wegetatywne — vegetative phase.

Tablica XIV. — Plate XIV.

- Cykl rozwojowy *Sp. myxococcoides*. B. Tworzenie mikrocyt.
Reconstruction of the life-cycle of *Sp. myxococcoides*. B. Microcysts formation.
- a — komórka wegetatywna — vegetative phase.
- b — e — zanik pasów chromatynowych — reduction of chromatin bands.
- d — łączenie się dwu pasów chromatynowych w płytkę równikową (e).
fusing of two chromatin bands in an equatorial plate (e).
- f — stadium przejściowe — transitional phase.
- g — i — pramikrocyta — praemicrocyst.
- k — dojrzała mikrocyta — mature microcyst.

Tablica XV. — Plate XV.

- 1 — Mikrocyty *Sp. myxococcoides* barwione metodą Gutsteina. W jednej mikrocyście widoczny nukleoid.
Sp. myxococcoides, microcysts, stained by Gutstein's technique. Cell-wall is deeply stained. Note the microcyst with the nucleoid (on the left).
- 2, 3, 4, 5 i 7 — Różne formy kielkowania mikrocyt. Barwione barw. Giemsa lub fioletem krysz. (nr 4).
Various forms of microcysts germination. Stained with Giemsa solution or with cristial violet (no 4). 3 hours - old culture.
- 6 — Mikrocyty *Sp. myxococcoides*, barwione fuksyną karbolową Ziehl-Neelsena.
Sp. myxococcoides, microcysts, stained with Ziehl-Neelsen's carbol fuchsin.
- 8 — Komórki wegetatywne, barwione barw. Giemsa; 4-dniowa hodowla.
Sp. myxococcoides, vegetative cells, stained with Giemsa solution; 4 day - old culture.
- 1, 2, 3, 5, 6 i 8 — $\times 1600$; 4 i 7 — $\times 2500$.

SUMMARY

In present investigations on cytology of *Sporocytophaga* three strains were used. Two of them conformed to the usual description of *Sporocytophaga myxococcoides* as given by Krzemieniewska (1933) and Stanier (1942). The third strain, named „N strain“, has been isolated from garden soil. It was rather similar to *Sporocytophaga myxococcoides*. The vegetative cells and the microcysts were smaller and the cell-wall of microcysts was less permeable to ordinary stains. Due to this microcysts very often looked as if they were empty (Pl. XII, a, c). This strain grew on the cellulose- and starch-agar. Ammonia salts, nitrates, asparagin, pepton and yeast-extract could be used as nitrogen source. On the cellulose strips on Omelianski's agar it developed orange-brownish pigment.

As there were no visible differences in the growth of *Sporocytophaga* on various tested media (Hutchison and Clayton, Waxman and Carey, Stanier, Omelianski) — the author used in course of investigations only Omelianski's medium.

For studying the cytomorphosis and the life cycle, the microcysts were allowed to germinate on collodion strips deposited on the Omelianski's agar in Petri dishes. At various time intervals these strips were mounted on the slides and examined in wet preparations in bright- and dark-field microscopy, as well in fixed and stained films. As a fixative the author used Chaboud's fluid, Carnoy's fluid or methyl alcohol. For staining of cell-wall the technique of Gutstein (1924, 1925a, 1925b), Knaysi (1941), Lewis (1941), Robinow (1947), and author's modification of Vahle's method (1909) were used. For demonstrating the nucleoids the author used methods of Feulgen (1924), Robinow (1947), Tulasne-Vendrely in Peshkoff's modification (1946), as well as staining with haematoxylin Delafield.

For identification of cell inclusions (fat, volutin, iogen ect) microchemical and solubility tests were utilised.

The protoplasm of *Sporocytophaga* appears perfectly homogeneous and has very slight affinity for ordinary bacteriological stains. It stains more deeply with Giemsa (Pl. XV, 8).

The cell-wall of the microcysts can be demonstrated with any special method of staining bacterial cell-wall (Pl. XII, a, b, Pl. XV, 1). The author was not able to accomplish plasmolysis of microcysts and vegetative cells,

contrary to Solnceva experience with other *Myxobacteria* (1941). The cell-wall (and the cell-membran which could not be separated from the cell-wall) is permeable to alcohols, acids, alkalies and fat-solvents, but its permeability for ordinary staining solutions is diminished, especially in *N-strain*. In vegetative cells it was not possible to demonstrate the distinct cell-wall. Only with author's modification of Vahle's method it is possible to make visible the outer part of the cell as more deeply stained layer. The existence of the cell-wall in vegetative cells can be then assumed on the basis of this observation and on the basis of indirect evidence (the constant cell form).

It was proved by micro-chemical methods and observations at various stages of growth that *Sporocytophaga* does not contain any reserve food materials (fat, carbohydrates). Volutin, or substance resembling it in micro-chemical reactions and solubility, occurs only in the microcysts in the state of highly dispersed or soluble material. The content of ribonucleic acid is very low and this substance could not be demonstrated in the vegetative cells; in the microcysts the central body (nucleoid) seems to contain ribo- as well desoxyribo-nucleic acids.

The nucleoid (giving positive Feulgen reaction), contrary to Imsheniecki's description (1940), could be observed in the microcysts (Pl. XV, 1). In vegetative cells the nuclear apparatus consists of several chromatin bands. The diffuse Feulgen reaction was never noted.

The changes in the nuclear apparatus during the process of microcysts formation was studied by means of Robinow's technique and that of haematoxylin staining (Pl. XIV).

The chromatin bands of the mother cell are reduced in number to two and assume the central position. During the process of shortening and thickening of the cell these two bands fuse into equatorial chromatin plate, stained more deeply than bands. This plate moves to one of the poles of the praemicrocyst and swells in the oval body. In the mature microcyst the resting nucleoid has a central position and appears quite distinct from surrounding protoplasm (Pl. XIV).

After a short period of incubation (one and a half to three hours) in a new favorable environment the microcysts start to germinate. They lose partly their affinity for dyes; the whole microcyst enlarges slightly and stains less deeply. The microcysts always germinate at one point. In this point one can observe the softening of the cell-wall and then a slight bulge.

The germination of the microcysts in *Sporocytophaga* occurs in two distinctly different types (Pl. XIII, Pl. XV, 2—5, 7).

In the first — most commonly observed — the bulge grows in germ-tube. It is thinner than microcyst and very often is bent. In this stage of germination the cell has a shape of a pear or of a hook. The nucleoid leaves the center, enters the bulge, and gradually elongates. When the young cell is ca 3 μ long — the nucleoid divides by constriction in two. Shortly afterwards there occurs division of the cell (Pl. XIII).

In the second type the changes in the nucleoid suggest some kind of sexual process in the life-cycle of *Sporocytophaga*.

The nucleoid divides here before entering the germ-tube. Only one of the newly formed nuclear bodies, destined to be cell's nucleoid, enters the bulge appearing on the microcyst. The other leaves the center of the microcyst and enters the periphery of the cytoplasm on the pole opposite to the germ-bulge. This nuclear body loses its distinct form and changes into a small granule which gradually disappears. These changes suggest the reduction of chromatin and, may be, they represent a part of the sexual (autogamic) process in *Sporocytophaga*. The first part of this process we could suppose to find in changes in nuclear apparatus during formation of the microcyst (fusing of two chromatin bands into equatorial plate). The crucial test would demand the isolation of a single cell.

In this connection the works of Badian (1930, 1933) and of Beebe (1941) on autogamic reproduction in other *Myxobacteriales* may be noted.

Anyhow the microcyst undoubtedly constitutes a special life phase of *Sporocytophaga* and has to be interpreted as an integral part of a periodic life-cycle.

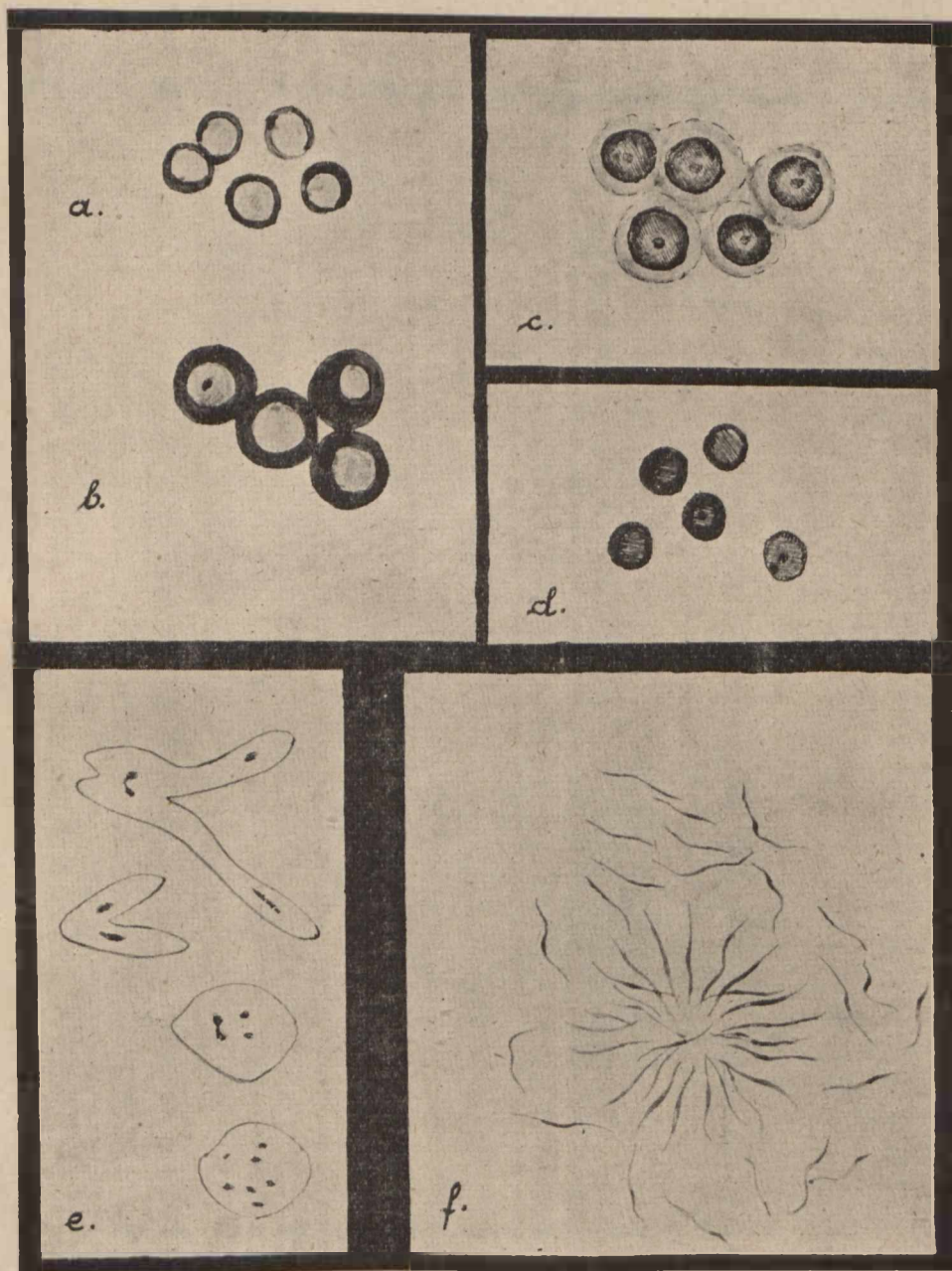
A question still at issue is the occurrence of isogamy in *Myxobacteriales*. Stapp and Bortels (1934) noted the process which they interpreted as a copulation. This observation the author could not confirm. Similar forms, suggesting copulation (Pl. XII, e), were only exceptionally observed by the author in stained preparations. It is hardly possible on the evidence at present available to come to any definite conclusion. The author is rather willing to look on these forms as involution forms or artefacts.

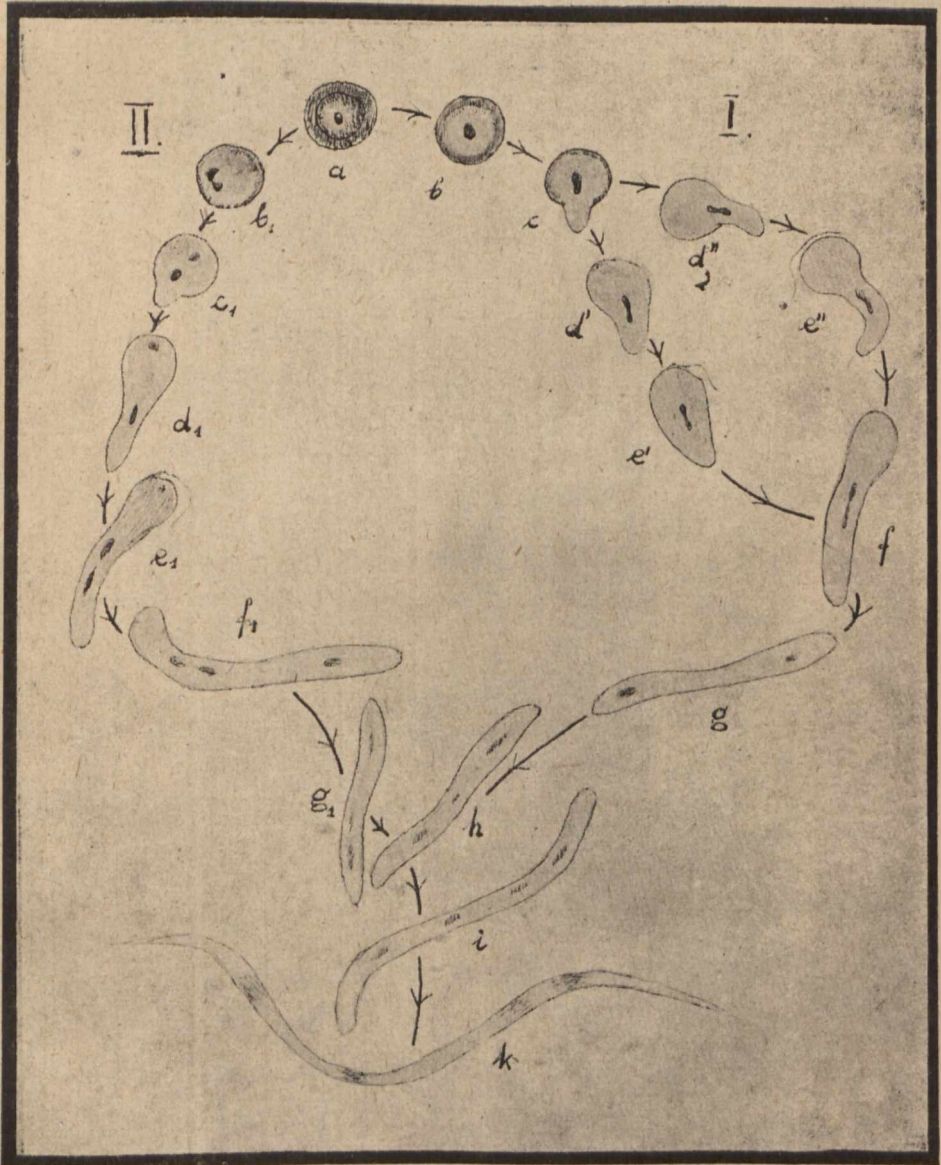
The question closely bound up with the germination of microcysts is the fate of microcyst's cell-wall. According to present observations the microcyst's coat is only partly absorbed and in most cases is visible shortly after germination, especially in the dark-field preparations.

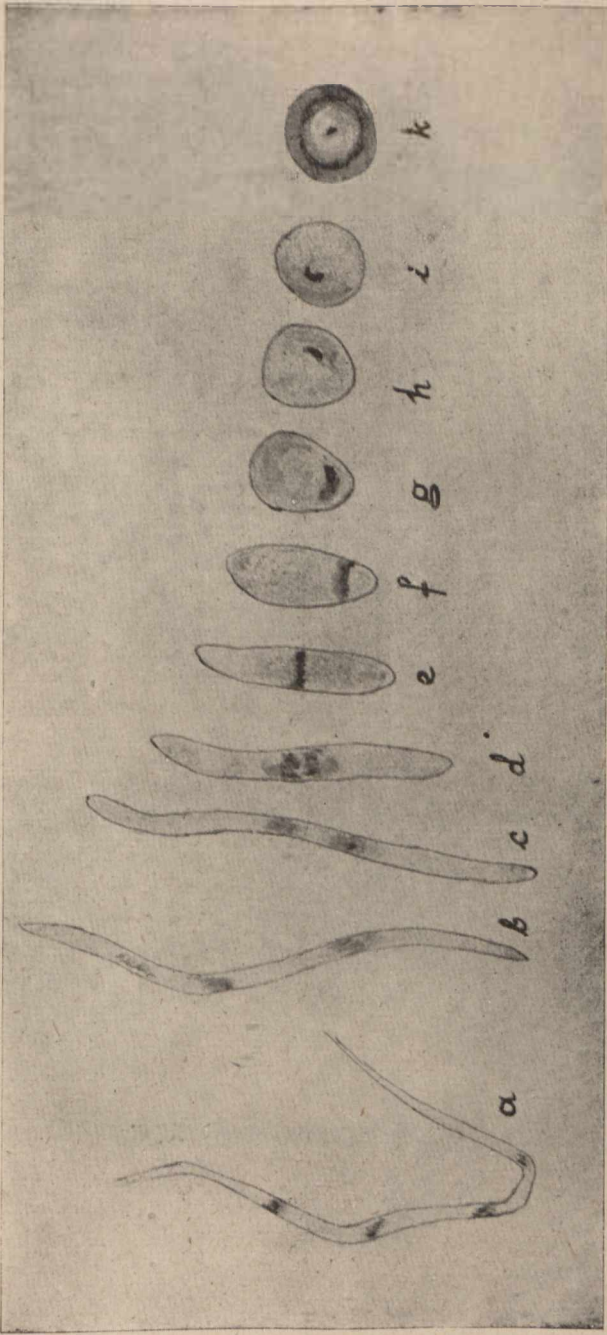
The classification of *Myxobacteriae* after the important papers of Stanier (1941) and Stanier and Van Niel (1941) is quite satisfactory to most microbiologists. Yet there is little agreement on the question of position of *Sporocytophaga* and *Cytophaga* in this system.

It seems to the author that the differences between *Cytophaga* and *Sporocytophaga* do not merit a separate rank of the family. These two genera should be included in the order *Myxococcales* as a distinct sub-order *Asporangiales* with one family — *Cytophagaceae* and two genera — *Cytophaga* and *Sporocytophaga*. It does not appear to the author that the differences in morphology, physiology, habitat and the life-cycle between *Cytophagaceae* and *Myxococcaceae* could be the basis for separating them in two distinct orders.









Władysław Kunicki-Goldfinger

auctor del.

