

L. RAKOCZY

## Z FIZJOLOGII ŚLIZOWCÓW Część II. Pływki

Śluzowce charakteryzują się specyficznym cyklem rozwojowym, za początek którego uważany jest proces kiełkowania zarodników. Proces kiełkowania zostaje zakończony w momencie wydobycia się na zewnątrz protoplazmatycznej treści zarodnika. Dotychczasowe dane dotyczące problemu kiełkowania zarodników śluzowców zostały zestawione w części I artykułu (Rakoczy 1962). Część II i III dotyczą fizjologicznych aspektów pływek i myksameb, które stanowią dalsze etapy cyklu życiowego śluzowców.

### Metody badania pływek i myksameb

Uzyskanie materiału do badań i przeprowadzanie obserwacji odbywa się zasadniczo w sposób podobny jak w badaniach dotyczących problemu kiełkowania zarodników.

Powszechnie stosowane bywa wysiewanie zarodników w kroplach wiszących, w komorze van Tieghema (Gilbert 1928, Smart 1937, 1938 i inni), w płynnym środowisku na szkiełkach zegarkowych (Kambly 1939) lub w płytkach Petriego na podłożu agarowym (Smith 1929, Kerr 1960, 1961, Collins 1961). Wysiewanie zawiesiny zarodników w komorze Gauthiereta, a także w formie normalnego preparatu mikroskopowego nie jest wskazane, gdyż, jak to wykazał Skupieński (1928), utrudniony dostęp tlenu hamuje zarówno kiełkowanie, jak i dalszy rozwój śluzowca. Ross (1957) uzyskiwał dobre rezultaty umieszczając zawiesinę zarodników w komorze van Tieghema na szkiełku pokrytym cienką warstwą 2% agaru. Ośrodkiem, w którym wysiewa się zarodniki może być woda destylowana lub wodociągowa (Kambly 1939, Smith 1929, Gilbert 1928) lub niskoprocentowe wyciągi z substancji organicznych (Smart 1937, 1938, Skupieński 1928)\*. Ze względu na drobne wymiary obiektów obserwacje przeprowadza się przy użyciu dużych powiększeń mikroskopu (40 ×, 60 ×, immersja wodna). W nowszych badaniach stosowany bywa z reguły kontrast fazowy lub duże powiększenie mikroskopu stereoskopowego (Collins 1961, Ross 1957). Podczas obserwacji wskazane jest unikanie zbyt silnego oświetlenia, gdyż może ono wpływać szkodliwie na pły-

\* Ross (1963) stosował ekstrakt tryptofanowo-drożdżowy z dodatkiem wyciągu z zarodka kurczęcia.

wki i myksameby, co prowadzi do ich zabicia lub encystacji (Gilbert 1928, Skupieński 1928, Howard 1931). Szczególnie wrażliwa na światło jest faza formowania się pływki (Skupieński 1928).

Obserwacje *in vivo* ułatwia barwienie przyżyciowe. Najczęściej stosowane barwniki to czerwień obojętna barwiąca wodniczki i ułatwiająca obserwacje ich kształtu, wymiarów, ruchów; stosowany bywa również błękit metylenowy barwiący cytoplazmę i zieleń Janusowa B barwiąca cytoplazmę i mitochondria. Barwniki te stosuje się w formie niskoprocentowych roztworów (1:5000 — Skupieński 1929, 1:10 000 — Kambly 1939, a nawet 1:20 000 — Howard 1931). Barwniki stosowane w niskich stężeniach nie wpływają szkodliwie na badane obiekty i rozwój zabarwionego materiału przebiega aż do wytworzenia zarodni włącznie (Skupieński 1929, Howard 1931).

Utrwalanie przeprowadza się bądź to w celu zatrzymania procesów rozwojowych na określonym etapie celem ich dokładniejszej analizy (Ross 1957), bądź dla uzyskania materiału dla badań cytologicznych. Utrwalanie przeprowadza się dodając do zawiesiny kultury umieszczonej np. na szkiełku zegarkowym, kroplę 2% kwasu osmowego lub też poddając kulturę działaniu par kwasu osmowego w ciągu 1—2 minut (Ross 1957). Inne typy utrwalaczy wywołują wyraźnie artefakty. Do barwienia preparatów trwałych używana jest hematoksylina Heidenheinsa, fiolet gencjanowy lub kwaśna fuksyna (Smith 1929, Howard 1931, Ross 1957 i inni).

Dla badań klonalnego rozwoju śluzowców stosowane są metody polegające na wyizolowaniu pojedynczych spor, poddaniu ich kiełkowaniu i doprowadzeniu do pełnego przebiegu cyklu rozwojowego w stałych kontrolowanych warunkach (Kerr i Sussman 1958). Izolacji zarodników dokonuje się pod dużym powiększeniem mikroskopu stereoskopowego (Collins 1961) i następnie umieszcza się po 1 zarodniku na odpowiednim podłożu. Collins (1961) w badaniach nad heterotalizmem śluzowców poddawał kiełkowaniu wyizolowane, pojedyncze zarodniki na płytkach Petriego na podłożu agarowym lub na płytkach przedzielonych na mniejsze komory szybkami szklanymi. Drugi sposób budzi pewne zastrzeżenia, bowiem myksameby mogą przejść do innej komory, o ile płytka rozdzielająca nie przylega bardzo dokładnie do podłoża.

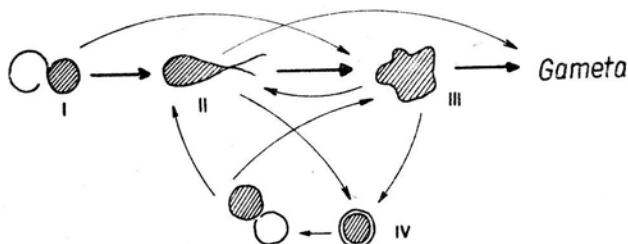
Wszystkie opisane powyżej metody opierają się na kulturach niesterylnych lub kulturach 2 członowych (mieszanych) — wolnych od przypadkowych zakażeń grzybami czy bakteriami, ale zawierających jeden znany szczep bakterii wysiany równocześnie ze sporami śluzowca, pływkami czy myksamebami lub nieco wcześniej. Zwykle jako drugi człon kultury stosowane są bakterie z gatunku *Aerobacter aerogenes* (Kerr i Sussman 1958). Dzięki obecności bakterii, które służą za pokarm, możliwy jest wzrost i rozmnażanie się kultur pływek i myksameb, bez zastosowania specjalnych, złożonych pożywek\*.

\* Po raz pierwszy Ross (1963) uzyskał kultury mikrobiologicznie czyste ameb *Badhamia curtisii* na pożywce z ekstraktem drożdżowo-tryptofanowym z dodatkiem wyciągu z zarodka kurczęcia, a więc także na podłożu o bliżej nieokreślonym składzie.

## Uwagi terminologiczne

Możliwe sekwencje poszczególnych faz rozwojowych obejmujących etap od momentu wykielkowania zarodników aż do fuzji gamet i wytworzenia plasmodium przedstawiono schematycznie na ryc. 1. Klasyczne ujęcie faz rozwojowych zaznaczono na schemacie grubymi strzałkami.

Wyswobodzony z zarodnika protoplast (I) postaci mniej lub bardziej kulistej i regularnej przekształca się w pływkę (II) o wyraźnie biegunowej budowie i zdolnej do ruchu dzięki obecności witek. Pływka z kolei wciąga witki, przyjmuje kształt nieregularny i przekształca się w myksamebę poruszającą się po podłożu ruchem amebowatym. Myksameby stają się następnie gametami. Nowsze badania wykazały jednak, że opisane następstwo faz nie jest bynajmniej obowiązujące dla wszystkich



Ryc. 1. Schemat możliwego następstwa form we wczesnych fazach rozwojowych śluzowca. I — kielkujący zarodnik, II — pływka, III — myksameba, IV — forma przetrwalna (oryg.)

śluzowców. I tak np. stwierdzono (Kerr 1960), że u niektórych gatunków protoplast wyswobodzony z zarodnika przekształca się bezpośrednio w myksamebę (I → III) lub że pływki nie przechodzą przez fazę myksameb, lecz bezpośrednio przejmują rolę gamet (II → gamety) (Howard 1931, Ross 1957), oraz że istnieje możliwość przemiany odwrotnej myksameby w pływkę (III → II) (Kerr 1960, 1961). Możliwości te zaznaczono na schemacie cienkimi strzałkami.

Niezależnie od opisanych przemian zarówno pływki, jak i myksameby mogą przechodzić w stadia przetrwalne, tj. tworzyć mikrocyсты (IV) o kulistym kształcie, otoczone cienką błoną. Kielkowanie mikrocyсты polega na wydostaniu się protoplastu z otaczającej błony. Protoplast z kolei przekształca się w pływkę (IV → II) albo w myksamebę (IV → III). Wśród przedstawionych sekwencji różnych form morfologicznych, dwie z tych form można wyraźnie zdefiniować: II — pływki-komórki o biegunowej budowie, posiadające witki jako organ ruchu i zdolne do wytwarzania nibynózek w tylnej części komórki. Termin polski określający tę fazę rozwojową jako pływki został wprowadzony przez Rostafińskiego (1875). Odpowiadają mu określenia: les zoospores (Pinoy 1908, 1921 i inni), zoospory (Skupieński 1928 i inne prace), swarm cells (Howard 1931, Ross 1957 i inni), Schwärmer (Jahn 1904, 1905 i dalsze). III- myksameby — komórki o niestalonej

biegunowości, mogące wysuwać pseudopodia w każdym punkcie swej powierzchni. Polskiemu terminowi pelzaki, myksameby odpowiadają: les mixamibes (Pinoy 1908, Skupieński 1920, 1926), myxamoebae (Ross 1957, Kerr 1960 a), Myxamöben (Jahn 1904 i dalsze).

Wydaje się, że wprowadzenie różnych terminologicznych określeń dla stadium II i III jest celowe. W literaturze spotyka się bowiem jeszcze inne określenia mogące czasem prowadzić do pomyłek w ich interpretacji. I tak np. Howard (1931) traktując pływki jako zasadniczą fazę rozwojową prowadzącą do uzyskania plasmodium nazywa myksamebę „ameboidalna pływka“ (ameboid swarm-cell), na odwrót Kerr (1960) opierając się na możliwości przemiany myksameby w pływkę zacierając różnicę terminologiczną między obu formami nazywając pływki myksamebami zaopatrzonymi w witki (flagellated amoebae, flagellated myxamoebae, a myksameby „non flagellated myxamoebae“. Dla określenia treści, która opuściła zarodnik (I) w starej literaturze spotyka się termin protoplast lub nieorganizowany protoplast (Gilbert 1928, i inni), w nowszych pracach określają tę formę jako myksamebę.

Opierając się na kryteriach morfologicznych, termin myksameba wydaje się w tym wypadku uzasadniony, gdyż myksameby mogą również przybierać formy zaokrąglone wciągając nibynóżki i przyjmując identyczną postać jak świeżo wydobyty z zarodnika protoplast. Dopóki zatem nie nastąpi stwierdzenie jakichkolwiek różnic fizjologicznych między formą I i III stosowanie obu terminów jest dopuszczalne.

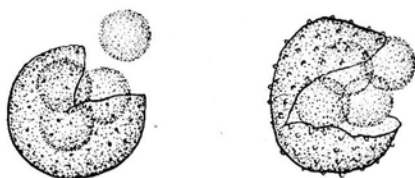
Poniżej zestawiono raz jeszcze terminy stosowane na określenie poszczególnych faz uwidocznionych na schemacie (ryc. 1) ujmując określenia nie polecane w nawiasy.

I	II	III
protoplast, myksameba.	pływka, (zoospora, myksameba zaopatrzona w witkę).	myksameba, pelzak, (pływka amebowata, pływka bezwitkowa).

### Powstawanie pylek

Pływki mogą powstawać w trojaki sposób: a) z protoplastu kielkującego zarodnika, b) przez przekształcanie myksameby, c) z mikrocyty. Pierwsza droga jest normalnym kierunkiem rozwojowym dla większości gatunków. Z kielkującego zarodnika wydobywa się na zewnątrz protoplast. Często przed pęknięciem błony zarodnika następuje podział jego treści i na zewnątrz wydostają się 2 lub 4 protoplasty (Heitzmanówna 1922, Skupieński 1928, Gilbert 1928 i inni), a nawet 8 protoplastów (Smith 1929). Dla niektórych gatunków jest to zjawisko stałe (*Badhamia orbiculata*, *Leocarpus fragilis*), u innych występuje sporadycznie, a u jeszcze innych nie występuje w ogóle (*Badhamia rubiginosa*, *Badhamia lilacina*).

Na przebadanych przez Smitha (1929) 62 gatunków śluzowców wydostawanie się 1—4 protoplastów z kielkującego zarodnika miało miejsce u 33 gatunków, przy czym zjawisko to występowało w 100% tylko u *Badhamia orbiculata*, podczas gdy u innych gatunków procent wydostawania się więcej niż jednego protoplastu był niższy, a dla jeszcze innych wynosił około 2% (ryc. 2). Zjawisko to widocznie nie jest charakterystyczne dla pewnych grup śluzowców, lecz występuje sporadycznie u wielu gatunków, a tylko w niektórych przypadkach ma charakter cechy gatunkowej (*Badhamia orbiculata*, *Leocarpus fragilis*). Protoplast po opuszczeniu zarodnika początkowo tkwi nieruchomo w miejscu pęknięcia błony (Gilbert 1928, Howard 1931, Bruck 1907). Czas ten wynosi dla *Reticularia lycoperdon* 10—15 minut (Gilbert 1928). Po tym czasie (dla innych gatunków przypuszczalnie czas



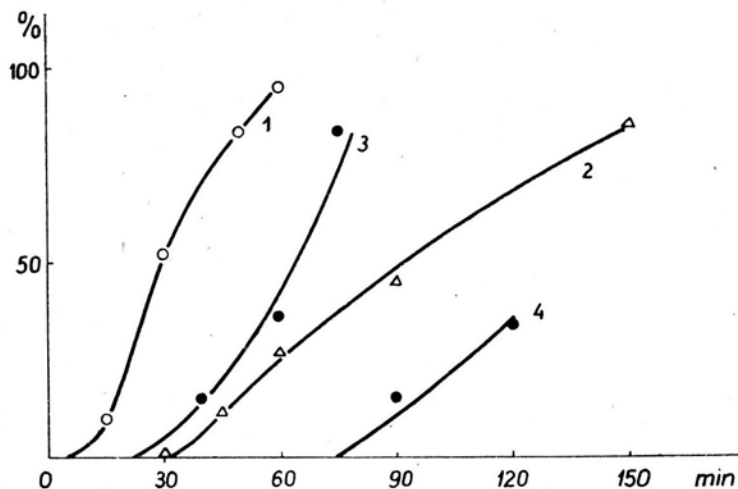
Ryc. 2. Kielkujące zarodniki *Leocarpus fragilis* (wg Gilberta 1928)

ten jest dłuższy lub krótszy) protoplast zaczyna wykonywać specyficzne ruchy wyginając się i wydłużając, w wyniku czego powstaje pływka o charakterystycznym gruszkowatym kształcie (Bruck 1907, Gilbert 1928, Howard 1931, Skupieński 1928). U niektórych gatunków procesy formowania się pływki następują znacznie wcześniej już w zarodniku, a po pęknięciu błony wydostaje się gotowa, uformowana pływka z wtką (Bruck 1907, Heitzmanówna 1922).

Dokładne poznanie warunków i przebiegu tworzenia pływek zawdzięczamy pracom Kerra (1960), który stwierdził u *Didymium nigripes* możliwość przejścia myksameb w pływki. Ameby uzyskane po wykiełkowaniu zarodników na podłożu agarowym w kontrolnych warunkach po przemyciu i odwirowaniu umieszcza się w środowisku płynnym, w którym następuje przemiana w pływki (Kerr 1960 a). Kerr wyróżnia 4 fazy przejścia myksameb w pływki:

1. Stadium ameboidalne, w którym myksameby wykazują szybki ruch za pomocą pseudopodiów; ponadto obserwuje się wzmożenie ruchu protoplazmy. W stałych warunkach faza ta trwa ok. 10 minut.

2. Stadium morfogenetyczne. Myksameby stopniowo zwalniają tempo ruchu i zaokrąglają się. Jakkolwiek ruch protoplazmy wewnątrz protoplastu utrzymuje się nadal, ruch lokomocyjny ustaje. Na powierzchni komórki pojawiają się i zanikają liczne wypukłości protoplazmy. W trakcie tej fazy protoplast uzyskuje biegunowość. Jądro ułożone  $\pm$  centralnie zostaje przesunięte w pobliże powierzchni komórki, później tworzy się blefaroplast. Pod koniec tego stadium pojawia się jedna wotka. Niektóre myksameby wytwarzają wtkę po około 10 minutach od



Ryc. 3. Powstawanie pływek z myksameb u *Didymium nigripes*. Odcięte: czas w minutach, rzędne: % pływek w populacji. Środowisko: 1—0.05 M NaHCO<sub>3</sub>, 2—woda, 3—0.02 M bufor fosforanowy (pH 6.2), 4—jak 3 + 0.1 mg/1 streptomycyny (wg Kerra 1960)

chwili zaprzestania ruchu lokomocyjnego, inne po 45 minutach. Większość komórek pozostaje w tym stadium przez 20 minut.

3. Stadium ameboidalno-witkowe. Nowe opatrzone witką komórki rozpoczynają ruch lokomocyjny po podłożu. Kontakt z podłożem ogranicza się tylko do końcowego odcinka, którym pływka pełza po podłożu. Dla większości ameb stadium to trwa 10 minut.

4. Stadium pływek. Po 10 minutach od chwili utworzenia pierwszej witki, komórki tracą zupełnie kontakt z podłożem i rozpoczynają wolne pływanie. Po 60 minutach inkubacji większa część komórek jest w stadium 3, a niektóre są już w stadium 4. Po 90 minutach wszystkie są w stadium 4. W kilka godzin po rozpoczęciu wolnego pływania pływki posiadają 2 witki.

Przytoczony powyżej czas tworzenia poszczególnych faz pływki, jak i całego przebiegu przemian myksameb w pływki, zależy wybitnie od warunków otoczenia. Kerr (1960 a) stwierdził, że dla przebiegu tych przemian optymalne jest środowisko zawierające 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.1). Nieco wolniej proces ten przebiega w 0.02 M buforze fosforanowym, jeszcze wolniej w wodzie, a w 0.05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> lub NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> myksameby nie przekształcają się w pływki (ryc. 3). Proces przemiany myksameb w pływki jest niezależny od gęstości populacji myksameb, należy więc wykluczyć wzajemny wpływ na siebie komórek, nie zależy również od tego, czy kultury znajdują się w ciemności czy w świetle. Natomiast może być zahamowany dodatkiem streptomycyny, która już w stężeniu 0.01 mg/ml wybitnie opóźnia przemianę. Efekt streptomycyny jest proporcjonalny do stężenia. Wyższe stężenia hamują przemianę myksameb w pływki w bardzo silnym stopniu.

## Budowa pływek

Ryc. 4 przedstawia wygląd pływki na podstawie obrazów uzyskanych za pomocą różnej techniki: utrwalonego i zabarwionego preparatu mikroskopowego (a), mikroskopu fazowego (b) i mikroskopu elektronowego (c). Syntetyczny schemat budowy pływki przedstawia ryc. 4 d.

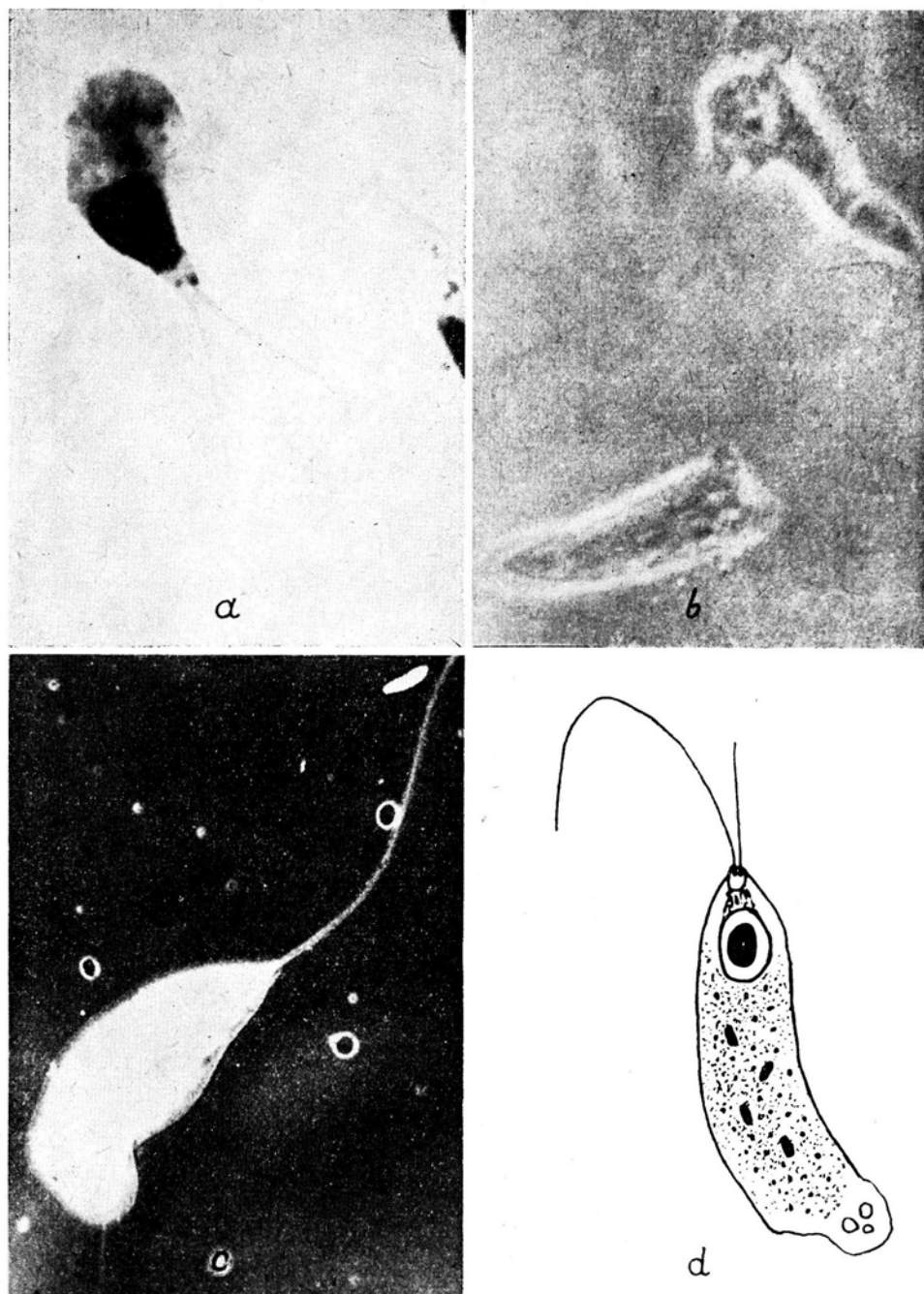
Pływki mają kształt wydłużony, gruszkowaty z wyraźnie zaznaczoną zaokrągloną częścią przednią, w której osadzone są witki i zaokrągloną częścią tylną. O ile kształt części przedniej jest mniej lub bardziej ustalony, w części tylnej następują częste zmiany kształtu (tworzenie nibynózek, uwypuklenia itp.). Pobieranie pokarmu stałego drogą amebocytozy odbywa się również w części tylnej komórki. Długość pływki wynosi około 20  $\mu$ , średnica 5—8  $\mu$ . Wyjątkowo niektóre gatunki mają pływki mniejsze, np. *Physarum viride*, *Stemonitis ferruginea*, *Lycogala epidendrum* (długość 9—10  $\mu$ , szerokość 2—3  $\mu$ , Gilbert 1928). Biegunowość budowy pływki wyraża się nie tylko w jej zewnętrznym kształcie, ale także w różnej strukturze protoplazmy części przedniej i tylnej i różnym rozmieszczeniu organelli komórkowych. Protoplasta przedniej części komórki jest mniej ziarnista i zwakuolizowana. W obrębie części tylnej protoplastu widoczne są prądy protoplazmy.

W protoplaście pływki występują 3 rodzaje wakuol: a) wodniczki trawiące w różnej liczbie i wielkości wytwarzane w związku z pobieraniem stałego pokarmu, b) jedna lub kilka wodniczek tętniących (pulsacyjnych), powstających i zanikających co 10 sekund (Kerr 1960 a). W przeciwieństwie do pierwotniaków wodniczki te nie mają stałego, ściśle określonego miejsca występowania, ale tworzą się w różnych punktach w części przybrzeżnej komórki (Skupieński 1928).

Skupieński (1928) opisuje ponadto jeszcze 3 kategorię wakuol występujących tak w pływkach jak i w innych stadiach rozwojowych, są to tzw. wakuole podstawowe (c), których liczba może się powiększać lub zmniejszać (wodniczki mogą zlewać się w większe). Wodniczki te barwią się silnie czerwienią obojętną.

Struktura powierzchni protoplastu pływki nie jest znana. Możemy przypuszczać, że występuje tu delikatna membrana otaczająca żywy protoplast. Badania potencjału elektrokinetycznego pływek wskazują, że charakter chemiczny błony pływki jest różny od charakteru błony myksameby (Korohoda 1964). Jądro pływki ma kształt wydłużony w kierunku dłuższej osi komórki i posiada duże, wyraźne jąderko (Jahn 1904, Kerr 1960). Jądro leży zawsze w przedniej części komórki blisko miejsca osadzenia witek. Z miejscem tym połączone jest ono włóknkową strukturą w kształcie dzwonu lub stożka, którą opisał Plenge (1890) jako części łączące (Verbindungstück), a która za Jahnem (1904) określana bywa jako blefaroplast.

Pochodzenie i rola blefaroplastu są nieznane. Być może powstaje on jako wytwór jądra lub tworzy się *de novo* z protoplazmy. Jahn (1904) uważa blefaroplast za przekształconą resztę wrzeczona mitotycznego. Blefaroplast nie wykazuje obecności RNA i DNA (Kerr 1960). Początkowo uważano, że pływki śluzowców są jednowitkowe. Obecność drugiej witki obserwowano sporadycznie (de Bary



Ryc. 4. Budowa pływki: a) pływka *Reticularia lycoperdon* utrwalona kwasem osmowym i zabarwiona hematoksyliną Heidenheinsa (wg Rossa 1957), b) pływki *Didymium nigripes* w mikroskopie fazowym (wg Kerra 1960), c) pływka *Reticularia lycoperdon* w mikroskopie elektronowym (wg Cochena 1960), d) schemat pływki wg Kerra 1960



1864, Gilbert 1927). Dopiero w ostatnich latach ustalono definitywnie, że pływki śluzowców są zasadniczo 2-witkowe (Elliot 1949, Ross 1957, Kerr 1960). W trakcie tworzenia się pływki druga witka powstaje później niż pierwsza, a ponieważ często przylega do ciała pływki jest trudno dostrzegalna. Odnosi się to szczególnie do preparatów utrwalonych. Ross (1957) wysuwa nawet przypuszczenie, że podczas utrwalania krótsza witka jest wciągana do wnętrza komórki. Długość dłuższej witki jest  $\pm$  równa długości komórki (około 20  $\mu$ ), witka krótsza ma około 6–8  $\mu$  długości (Ross 1957, Kerr 1960). Średnica witek, o ile można wnioskować z obrazów w mikroskopie elektronowym jest rzędu 0.7  $\mu$ . Witki zakończone są u podstawy ciałem podstawowym mającym postać ziarenka silnie barwiącego się hematoksyliną żelazistą (Jahn 1904) i będącym centrum kinetycznym witki. Ciało podstawowe otoczone jest bezziaarnistą warstwą ektoplazmy o dużym współczynniku załamania światła, które różni autorzy traktują jako zaczątek blefaroplastu (Kerr 1960). Brak jest badań nad strukturą witek śluzowców. O ich budowie możemy wnioskować tylko przez analogię ze strukturą witek innych organizmów (Flawcett 1961).

### Fizjologia pływek

Odżywianie. Powszechnie przyjmuje się, że pływki mogą się odżywiać zarówno przez pobieranie całą powierzchnią substancji organicznych rozpuszczonych w wodzie, jak i przez pobieranie stałego pokarmu drogą amebocytozy. O ile drugi sposób odżywiania jest w pełni udowodniony, o tyle na potwierdzenie pierwszego nie dysponujemy materiałem eksperymentalnym. Zarówno jednak analogie z innymi organizmami jednokomórkowymi, jak i zjawisko chemotaksji pływek sugerują, że tzw. osmotyczny sposób odżywiania jest możliwy. Nasuwa się tylko pytanie, czy może on być jedynym i wystarczającym sposobem odżywiania.

Gilbert (1928) uważa, że pobieranie rozpuszczonego pokarmu nie jest wystarczające dla zapewnienia normalnego rozwoju pływek czy myksameb. Niemożność uzyskania, jak dotąd, sterylnych kultur pływek na pożywkach syntetycznych czy płynnych wyciągach organicznych o znanym składzie zdaje się potwierdzać tę tezę. Nie jest jednak wykluczone, że przeszkodą w tym względzie jest brak jakiegoś czynnika odżywczego występującego w żywych komórkach służących za pokarm pływek czy myksameb, a nieobecnego w stosowanych dotąd pożywkach płynnych.

(Smith (1929) uzyskał wprawdzie zaawansowany rozwój od zarodników aż do uformowanego plasmodium w czystej wodzie, ponieważ jednak sterylność w pracy nie była przestrzegana trudno na podstawie tego eksperymentu wyciągnąć wiążące wnioski.

Jak dotąd dalszy rozwój i rozmnażanie pływek uzyskuje się jedynie stosując jako źródło pokarmu bakterie (Skupieński 1928, Kerr 1960, Collins 1961), zarodniki lub strzępki grzybów (Lister 1890, Gilbert 1928, 1929) lub inne stałe cząstki organiczne. W nowszych pracach prowadzonych przy zastosowaniu kultur

2-członowych stosuje się z reguły jako drugi człon kultury szczep bakterii *Aerobacter aerogenes*. Kerr i Sussman (1958) opracowali metodę polegającą na szczepieniu zawiesiny zarodników lub myksameb względnie pływek na pożywcę agarowej (2 g bacto peptonu, 2 g glukozy, 0.2 g ekstraktu drożdżowego, 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 g agaru, na litr wody. pH—6.3) z dodatkiem 0.3 ml. 48-godzinnej zawiesiny bakterii.

Gilbert (1928) przeprowadził obszerne studia nad odżywianiem się pływek zarodnikami grzybów. Wyróżnia on kilka typów śluzowców różniących się sposobem odżywiania w zastosowanych warunkach laboratoryjnych (zarodniki wysiewano w wodzie, do której dodano spory grzybów).

a) U pewnych gatunków (*Dictydiaethalium plumbeum*, *Leocarpus fragilis*, *Trichia floriformis*) pływki po okresie wolnego pływania trwającego kilka godzin do kilku dni przechodzą do ruchu pełzającego i wówczas pobierają stały pokarm.

b) Pływki bardzo prędko po uformowaniu (wkrótce po wyjściu protoplastu z zarodnika) zaczynają ruch pełzający i są zdolne do pochłaniania spor grzybów. (*Hemitrichia vesparium*, *Badhamia lilacina*, *Badhamia magna*, *Didymium xanthopus*).

c) Pływki pozostają stale w formie pływającej wolno i w związku z tym nie obserwowano pobierania przez nie pokarmu stałego (*Reticularia lycoperdon*, *Fuligo septica*, *Stemonitis fusca*).

d) W ostatniej grupie (*Hemitrichia clavata*, *Arcyria denudata*, *Arcyria incarnata*) pływki przechodzą wprawdzie do ruchu pełzającego, ale z niewiadomych przyczyn nie pobierają pokarmu stałego (w tym wypadku spor grzybów) mimo pozornie sprzyjających warunków.

Powyższe wyróżnione przez Gilberta typy nie są identyczne z podziałem Rossa (1957), (por. str. 56), gdyż kryterium podziału na grupy nie stanowi utrata witki i przemiana w myksamebę, lecz rodzaj ruchu (wolny lub pełzający) wykonywany przez pływkę.

Pływki nie pobierają pokarmu w okresie gdy pływają wolno w środowisku i gdy tylna część posiada zaokrągloną powierzchnię bez nibynózek. Natomiast w okresie ruchu pełzającego tylna część pływki wykształca delikatne pseudopodia (ryc. 4). Pobieranie stałego pokarmu (spor) odbywa się w ten sposób, że jedno lub kilka takich pseudopodiów przyczepia się do napotkanej cząstki i następnie, kurcząc się, wciąga ją do wnętrza ciała, podczas gdy tworzące się równocześnie boczne uwypuklenia protoplazmy otaczają pobieraną cząstkę i zamykają ją w formie wodniczka (Gilbert 1928). Ten typ amebocytozy jest nieco różny od typu występującego u myksameb czy plasmodium, gdzie pobierana cząstka jest po prostu oblana ze wszystkich stron protoplazmą. Pobrana cząstka zamknięta w wodniczku jest następnie trawiona.

Wodniczek trawienny może znajdować się w jakiegokolwiek części protoplastu byle nie zbyt blisko jądra i często jest przesuwany w różne miejsca w obrębie komórki, zwłaszcza w środkowej i tylnej jej części. Proces trawienia przebiega w ciągu

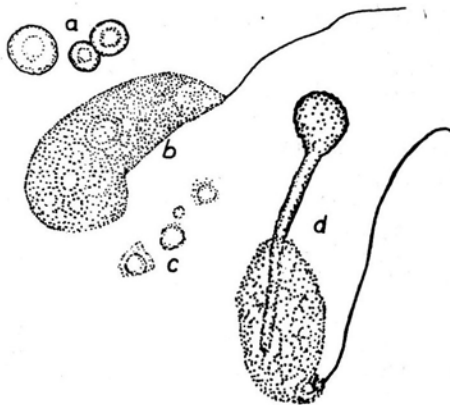
kilku godzin. Pobrana cząstka staje się coraz mniejsza i mniej wyraźna, w końcu zostaje rozpuszczona za wyjątkiem niestrawialnych części, jak np. krople tłuszczu (Gilbert 1928).

Skupieński (1928) śledził proces trawienia przy zastosowaniu barwienia czerwieńią obojętną i wykazał, że pobrane żywe bakterie (nie barwiące się) zostają najpierw zabite (wówczas barwią się bardzo silnie ciemnoczerwono i są wyraźnie widoczne na pomarańczowym tle wakuoli), po czym stopniowo ulegają trawieniu. Ten sam autor podaje także, że metodą barwienia można wykazać całą gamę przejść od niestrawionych do nadtrawionych w różnym stopniu bakterii. O ile pływki spotykają na swej drodze dostateczną ilość właściwego pokarmu pobierają go wielokrotnie, tak że w obrębie jednej pływki można stwierdzić wiele wodniczków, np. z zarodnikami grzybów w różnym stopniu trawienia (ryc. 5). Pływki takie stają się ociążałe, powiększają swoje wymiary i mogą okresowo przyjmować nietypowe kształty. Poruszają się wolno, a niekiedy okresowo wciągają witki. Niestrawione części zostają wydalone w ten sposób, że wodniczek trawienny zbliża się do powierzchni protoplazmy i tu otwiera się wyrzucając niekiedy eksplozywnie resztki pokarmu do środowiska (Gilbert 1928).

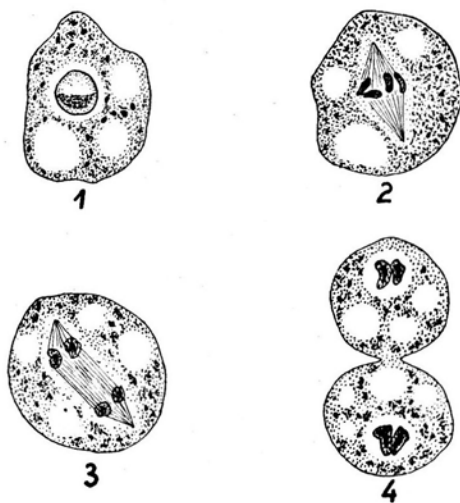
Badania nad zastosowaniem zarodników różnych grzybów jako materiału pokarmowego (Gilbert 1928) wykazały, że na ogół pływki nie wykazują specyficznej gatunkowo wybiórczości w stosunku do zarodników i pobierają to co napotkają na swej drodze. Jedynie, jeśli wymiary spor są zbyt wielkie (przekraczają ok. 1/5 wymiaru pływki), spory takie nie są pobierane. Tak więc raczej wielkość, a nie specyficzne właściwości chemiczne zarodnika decydują o jego pobraniu. Różnice występują natomiast w szybkości trawienia. Zarodniki takich grzybów jak *Monilia candida*, *Mucor ramanianus* i inne są szybko trawione, podczas gdy spory innych gatunków znacznie wolniej, a zarodniki np. *Trichoderma lignorum*, *Pullularia nigricans*, chociaż są pobierane, nie są nigdy trawione i po krótszym lub dłuższym czasie zostają w całości wydalone. O ile przypadkiem do wodniczka trawiennego dostaną się cząstki karminu lub krzemionki są one traktowane jako ciała obce i bardzo szybko wyrzucone.

Rozmnażanie. Pływki rozmnażają się przez podział. Przed podziałem następuje wciągnięcie witki i zaokrąglenie kształtów. Jądro dzieli się mitotycznie, po czym następuje podział komórki przez przewężenie (Skupieński 1928, Ross 1957). Ryc. 6 przedstawia kilka faz podziału pływki względnie myksameby (u której podział przebiega analogicznie). Podziały mogą powtarzać się wielokrotnie w trakcie fazy pływki i w kulturach wielopływkowych nie są zsynchronizowane. W każdym okresie rozwoju wegetatywnego można stwierdzić komórki dzielące się (Ross 1957). Tempo rozmnażania zależy od warunków (temperatura, pożywienie itp.). W typowej kulturze można jednak stwierdzić fazę rozwoju logarytmicznego przechodzącą następnie w fazę stacjonarną (Kerr 1961). Tempo przyrostu liczby pływek *Didymium nigripes* na pożywce agarowej z brucyną (GPY), zawierającej *Aerobacter aerogenes* według obliczeń hematocymetrycznych, przedstawia ryc. 7.

Ruch. Jak już wspomniano, pływki mogą się poruszać w dwojaki sposób;



Ryc. 5. Pobieranie i trawienie zarodników grzybów: a) spory *Monilia candida*, b) pływka *Dictydiaethalium plumbeum* z licznymi pobranymi zarodnikami, c) niestrawione wydalone resztki (a—c wg Gilberta 1928 a), d) pływka *Dictydiaethalium plumbeum* otaczająca strzępkę kiełkującego zarodnika (wg Gilberta 1928 b).

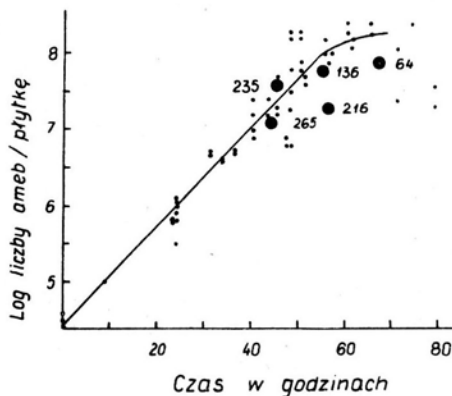


Ryc. 6. Podziały pływki (wg Skupińskiego 1928).

pełzający i wolnopływający. W pierwszym, pływka opiera się tylnym końcem wytwarzającym wówczas drobne pseudopodia o podłoże i pełza po nim, podczas gdy przednia część skierowana jest mniej lub bardziej stromo w górę. W ruchu wolnopływającym pływka odrywa się od podłoża i dzięki szybkim ruchom witki skierowanej naprzód płynie ruchem śrubowym. Niezależnie od charakterystycznej dla danego gatunku przewagi jednego lub drugiego typu ruchu, większość pływek może okresowo zmieniać jeden typ na drugi. Pływki poruszające się wolno wykazują wyraźny chemotaktyzm w stosunku do szeregu substancji. Własności chemo-

taktyczne łatwo wykazać umieszczając w preparacie z pływkami kapilarę wypełnioną badanym roztworem. Na skutek dyfuzji wytwarza się koło wylotu kapilary gradient stężenia tej substancji. O ile pływki skupiają się bezpośrednio przy wylocie kapilary, lub do niej wchodzi, stężenie użytego roztworu przyjęto uważać za graniczne (Kusano 1909).

Stosując opisaną metodę Stange (1890) stwierdził, że pływki *Chondrioderma difforme* (obecna nazwa *Didymium difforme*) wykazują wyraźny chemotaktyzm



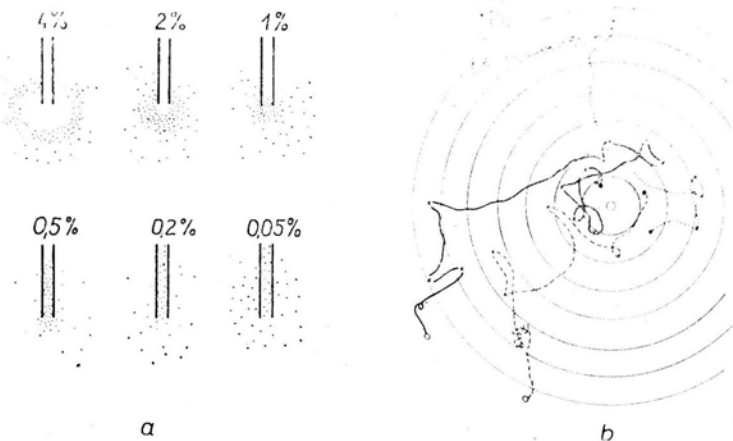
Ryc. 7. Krzywa wzrostu kultury pływek *Didymium nigripes* na pożywce agarowej GPY i z bakteriami *Aerobacter aerogenes*. Odcięte: czas w godzinach, rzędne: logarytm liczby pływek na płytce. Cyfry przy ciemnych punktach oznaczają zdolność do tworzenia plasmodium. (P/1000). Wg Kerra 1961.

w stosunku do kwasu jabłkowego (ryc. 8a), nieco słabszy do kwasu mlekowego i masłowego. Podobne działanie przyciągające wywierają sole Na i Li tych kwasów, podczas gdy ester etylowy kwasu jabłkowego działa chemotaktycznie ujemnie. Pływki *Aethalium septicum* (*Fuligo septica*) były najsilniej przyciągane przez kwas mlekowy, masłowy i walerianowy, znacznie słabiej przez jabłkowy i winowy. O ile użyto mieszaniny dwu kwasów, z których jeden wywoływał działanie przyciągające, a drugi był go pozbawiony — działanie mieszaniny zależało od stosunku użytych kwasów. Z poniższej tabeli wynika, że odpychające działanie kwasu octowego mogło być zneutralizowane przyciągającym działaniem kwasu masłowego.

Kwas octowy	Kwas masłowy	Działanie
1 %	2 %	silnie przyciągające
1 %	1 %	słabo „
1 %	0,5 %	odpychające

Z faktu, że chemotaktyzm dodatni wywierają zarówno kwasy, jak i ich sole wyciąga Stange (1890) wniosek, że ważny jest w tym wypadku rodzaj anionu. Do nieco innych wniosków dochodzi Kusano (1909) wykazując, że pływki *Aethalium* (*Fuligo*), *Stemonitis* reagują + chemotaktycznie na wszystkie kwasy w niskich

stężeniach, przy czym istotne dla tego działania jest stężenie jonów wodorowych. Sprzeczność z danymi Stange (1890) tłumaczy Kusano (1909) niedostatecznym czasem koniecznym dla wytworzenia gradientu stężeń. Według Kusano (1909) nawet kwas siarkowy działa + chemotaktycznie (stężenie graniczne 1/2000 mol.). Wyższe stężenia jonów H oraz jony OH działają odpychająco. Skupienie chemotaktyczne polega na reakcji typowo fobotaktycznej objawiającej się w ruchu pływek.



Ryc. 8. Chemotaktyzm pływek: a) schemat doświadczenia Stange (1890). Zgrupowanie pływek koło wylotu kapilary napełnionej roztworami kwasu jabłkowego o różnym stężeniu, b) droga ruchu 3 pływek w okolicy centrum dyfuzyjnego M/20 kwasu jabłkowego w ciągu 4—8 minut, o—położenie początkowe, ●—położenie końcowe (wg Kusano 1909).

Przy przejściu do nieodpowiedniego stężenia pływka reaguje gwałtownym cofnięciem się i zmianą kierunku ruchu (Kusano 1909). (Ryc. 8b).

Temperatura ma wyraźny wpływ na szybkość i formę ruchu. Jak wynika z pracy Smarta (1938) najbardziej korzystna temperatura dla aktywności pływek większości śluzowców leży w granicach 27—34° C (tab. I). Pływki mogą jednak znosić bardzo szerokie zmiany temperatury bez szkody dla siebie. Większość gatunków w temperaturze 7° C, a niektóre (*Fuligo septica*, *Enteridium rozeanum*, *Arcyria denudata*, *Hemitrichia vesparium*) nawet w temperaturze 2° C wykazują ruch i nie encystują. Zarodniki *Fuligo septica* wykiełkowane w normalnej temperaturze, a następnie przeniesione do 4° C utrzymują się przeszło 4 miesiące w stanie aktywnym. Pływki w takich warunkach nie dzielą się i rzadsze staje się ich wolne pływanie. Większość pływek osiada na podłożu i wykazuje tylko powolne wahania witek. Po przeniesieniu z normalnej do wysokiej temperatury pływki zatrzymują się w ruchu postępowym, wykonują przez kilka minut ruchy obrotowe wokół swej osi po czym zaczynają pływać w kierunku przeciwnym do poprzedniego. Gdy temperatura dalej rośnie, po kilku następujących po sobie reakcjach rotacji, pływki osiadają przyjmując kształty ameboidalne. W miarę dalszego wzrostu temperatury zaokrą-

glają swój kształt, wciągają witkę, po czym następuje ustanie ruchów plazmatycznych. Przy obniżeniu temperatury zachodzą odwrotne procesy odtwarzające typową witkę. Dopiero gdy wysoka temperatura działa długi czas (30—60 minut) unieruchomiony protoplast tworzy mikrocystę. Tabela I podaje przykładowo temperatury graniczne dla kilku gatunków śluzowców (według Smarta 1938).

Tolerancja pływek na temperaturę jest znacznie większa w porównaniu do procesu kiełkowania zarodników (por. cz. I). Smart (1938) widzi w tym duże znaczenie biologiczne. Występujące w warunkach naturalnych znaczne wahania temperatury zmniejszają tylko aktywność pływek nie powodując ich encystacji, dzięki czemu unika się opóźnienia rozwoju, które wynikałoby z konieczności kiełkowania cyst.

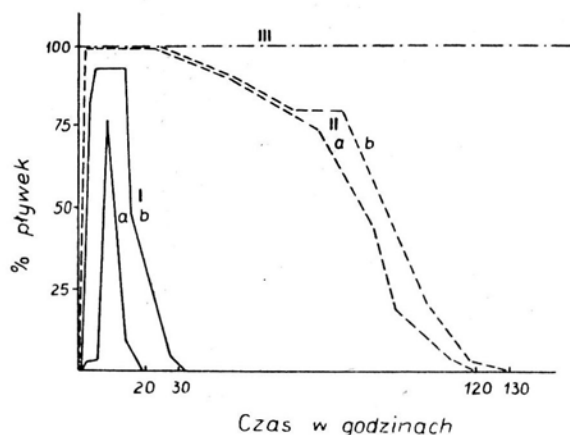
Przekształcanie się pływek w myksameby. Przekształcanie się pływek w myksameby odbywa się według Skupieńskiego (1928) stopniowo. Początkowo

TABELA I

Gatunek śluzowca	Temperatura normalnej aktywności	Temperatury graniczne:	
		ruchu witek	ruchów amebowatych
<i>Fuligo septica</i>	31—33,5	34—36	39—41,5
<i>Badhamia utricularis</i>	28—30	30—32	35—38
<i>Physarum didermoides</i>	32—34	35—36	40—43
<i>Reticularia lycoperdon</i>	26—30	34—36	39—42
<i>Enteridium Rozeanum</i>	27—30	34—36	39—42
<i>Diachea leucopodia</i>	26—28	30—31	34—36,5

pływka osiada na podłożu i wykonuje ruchy czołgające, zachowując przez dłuższy czas swoją dwubiegunowość. Po pewnym czasie zatracą regularny dwubiegunowy kształt i zaczynając od tylnego odcinka przybiera nieregularną formę pełzaka (ryc. 10). Witka przez pewien czas jeszcze istnieje, po czym zostaje wciągnięta w głąb komórki. Obecność witki w amebowatej pływce nie ma znaczenia dla jej ruchu, bowiem komórka porusza się w dowolnym kierunku wlokąc wic za sobą. Po wciągnięciu witki aparat jądrowowitkowy przesuwa się w głąb ciała i staje się hialoplazmatyczną otoczką równomiernie rozmieszczoną dookoła jądra. Długość fazy rozwojowej, jaką śluzowiec przechodzi w postaci pływki, zależy w znacznym stopniu od warunków zewnętrznych. Pływki jako formy typowe dla środowiska płynnego rozwijają się normalnie w takim właśnie środowisku, a przy kiełkowaniu zarodników na pożywce zestalonej agarem stadium to może być w ogóle pominięte. Skupieński (1928) podaje, że przy wysiewaniu zarodników *Didymium difforme* na pożywce agarowej wytwarzają się od razu myksameby. Tylko w miejscach, gdzie znajdowała się woda kondensacyjna na agarze pojawiały się pływki, które dopiero po pewnym czasie przekształcały się w myksameby.

Długość trwania fazy pływki jest jednak równocześnie cechą gatunkową. Stosując wysiewanie spor różnych gatunków śluzowców w warunkach standardowych (zawiesina zarodników umieszczona na cienkiej warstwie agaru w komorze van Tieghema) wyróżnia Ross (1957) 3 grupy gatunków różniących się okresem trwania stadium witkowego. (Ryc. 9). I — typ o krótkiej fazie witkowej, dla którego dominującą jest faza myksameb. U gatunków należących do tego typu (*Didymium squamulosum*, *Physarella oblonga*) formy z witkami pojawiają się zwykle dopiero



Ryc. 9. Czas trwania fazy witkowej. Odczyte: czas w godzinach, rzędne: % pływki w populacji. (typ I), a) *Didymium squamulosum*, b) *Physarella oblonga* (typ II), a) *Fuligo septica*, b) *Physarum polycephalum* (typ III), *Enteridium rozeanum*, *Reticularia lycoperdon*, *Dictydium cancellatum*, *Stemonitis nigrescens*. Wg Rossa 1957.

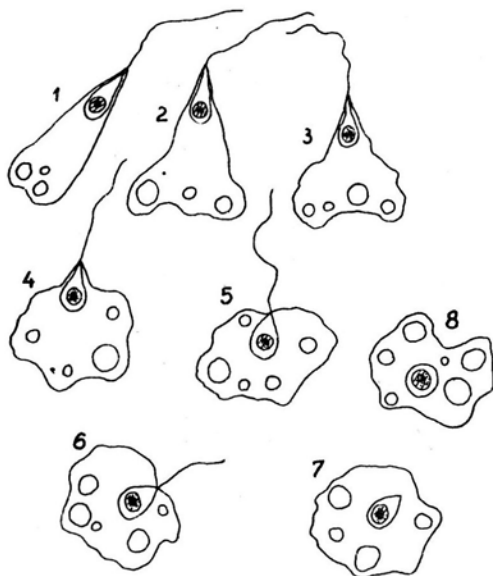
w kilka godzin po kiełkowaniu, a po 20—30 godzinach zanikają zupełnie. Wszystkie komórki przyjmują postać myksameb.

II — typ o średnio długiej fazie witkowej. Pływki pojawiają się bardzo szybko po wykiełkowaniu i stanowią formę dominującą. Formy amebowate spotyka się w znikomym procencie. Stadium to trwa do około 80 godzin hodowli, po czym pływki kopulują wskutek czego liczba ich maleje. Po 120—130 godzinach brak form witkowych. Komórki, które nie przeszły syngamii encystują. Do tego typu należą: *Physarum polycephalum* i *Fuligo septica*.

III — typ o wyłącznej fazie witkowej. Nie dochodzi w ogóle do wykształcenia myksameb. Do tego typu należy większość gatunków, np. *Reticularia lycoperdon*, *Stemonitis nigrescens*, *Enteridium rozeanum*. Wytworzenie pływki następuje bezpośrednio po kiełkowaniu. W przeciwieństwie do typu II faza pływki trwa czas dłuższy (np. u *Reticularia lycoperdon* do 3 tygodni) zanim nastąpi syngamia i tworzenie plasmodiów. W kulturach gatunków należących do typu III obserwowano powstawanie myksameb jako zjawisko zupełnie wyjątkowe, występujące np. przy powolnym wysychaniu preparatu, przy czym myksameby przekształcały się szybko w pływki, z chwilą wzbogacenia preparatu w wodę.



Zjawisko zróżnicowania czasu trwania fazy witkowej posiada pewien aspekt ewolucyjny. Według hipotezy Martina (1940) śluzowce wywodzą się od bezbarwnych wiciowców. Jak twierdzi Ross (1957) długotrwałe stadium witkowe wskazywałoby zgodnie z tą hipotezą na bardziej prymitywną formę. Długie stadium ame-



Ryc. 10. Przekształcanie się pływek w myksameby (wg Skupińskiego 1928).

boidalne stanowiłoby zatem krok naprzód w ewolucji śluzowców. Tak więc zbadane przez Rossa (1957) gatunki należące do rodzin: *Reticulariaceae*, *Trichiaceae*, *Stemonitaceae* stanowią grupę pierwotniejszą, natomiast grupa *Physarales* byłaby grupą bardziej posuniętą w rozwoju ewolucyjnym.

Problemy dotyczące powstawania zygot jak również literatura zostaną podane w części III artykułu.