Badania nad *Bacterium prodigiosum*. Warunki rozwoju bakterji i występowanie prodigiozyny. (Recherches sur *Bacterium prodigiosum*. Conditions du développement de la bactérie et la production de la prodigiosine).

Napisał

WACŁAW MOYCHO.

Wstęp.

U niższych organizmów roślinnych spotykamy dużą różnorodność barwików; wśród bakteryj, naprzykład, występują zabarwienia czerwone, żółte, brązowe, zielone, niebieskie, fioletkowe. Zdarza się, że zbliżone zabarwienie pochodzi od ciał chemicznie odmiennych: zabarwienie czerwone może być spowodowane przez karotynę, bakterjopurpurynę i prodigiozynę.

Barwiki organizmów niższych mało są zbadane pod względem chemicznym, a ich znaczenie fizjologiczne, zarówno jak i powstawanie, pozostaje niewyjaśnione. Wśród tych barwików stosunkowo najlepiej zbadano prodigiozynę, występującą u *Bacterium prodigiosum*. Griffiths (8) przypisuje prodigiozynie wzór $C_{38}H_{56}NO_5$. Scheurlen (16) kwestjonuje obecność azotu. W ostatnich czasach Fr. Wrede i Otto Hettche (20) po gruntownem oczyszczeniu prodigiozyny ustalili jej wzór na $C_{20}H_{25}N_3O$.

Prodigiozyna rozpuszcza się w alkoholu, eterze, chloroformie i siarczku węgla; jest natomiast nierozpuszczalna w wodzie. Powyższe własności nadają prodigiozynie charakter lipochromu.

Liczni autorzy, a osobliwie M. Hefferan (9) i Sullivan (19), badali wpływ składu pożywki na zdolność wytwarzania prodigiozyny przez *Bact. prodigiosum*. Podług tych badań dodatek takich ciał, jak skrobia, sacharoza, glikoza, gliceryna, asparagina, sole amonowe sprzyja wytwarzaniu się barwika. Magnez uchodzi za nieod-

zowny. Brak tlenu, podobnie jak temperatura powyżej 37° C, hamuje powstawanie barwika, jakkolwiek powyższa temperatura sprzyja wzrostowi bakteryj.

W ostatnich czasach Gorbach (7) potwierdził wiele z tych danych, ponadto, hodując *Bact. prodigiosum* na pożywce mineralnej z dodatkiem asparaginy, czy też NH_4Cl jako źródła azotu i gliceryny jako źródła węgla, stwierdził, że kwasowość, najbardziej sprzyjająca wytwarzaniu się barwika, leży około $\text{pH} = 6.4$; dla wzrostu natomiast optimum stężenia jonów wodorowych wynosi $\text{pH} = 7$ lub niżej nieco.

Co do powstawania prodigiozyny, to jest rzeczą znaną, że młode nawet bardzo obfite hodowle *Bact. prodigiosum* w pożywkach płynnych są początkowo bezbarwne; zabarwienie występuje dopiero później. Podług Beyerinck'a (3) należy zaliczyć tę bakterję do t. zw. chromoparowych, u których treść komórki pozostaje niezabarwiona, a barwik występuje nazewnątrż komórki; nie stanowi on więc części składowej komórki, jak to ma miejsce u bakterij „chromoforowych“. Wnosić stąd należy, że komórka wytwarza nie barwik gotowy, ale raczej chromogen, który w następstwie dopiero przeobraża się we właściwą prodigiozynę.

Celem pracy niniejszej było zbadanie: 1) wpływu rozmaitych stężeń H^+ na przebieg rozwoju *Bact. prodigiosum*, 2) samoistnej zmiany stężenia H^+ pod wpływem bakterij, a ponadto 3) zbadanie ewentualnej zależności pomiędzy chwilą pojawienia się barwika a stopniem rozwoju kultury *Bact. prodigiosum*. W ciągu pracy wysunęło się zagadnienie, dotyczące roli tlenu dla rozwoju tej bakterji.

Stężenie H^+ od czasu, kiedy Sörensen (18), a potem Michaelis (11) wykazali jego wpływ na zjawiska biologiczne, odgrywa coraz rozleglejszą rolę w badaniach mikrobiologicznych. Natomiast stopień rozwoju kultury, sprowadzający się do obliczenia komórek w pewnej objętości hodowli, nie znajdował dotychczas należytego uwzględnienia.

Jeżeli weźmiemy pod uwagę charakter badań fizjologicznych nad organizmami wyższymi, zwierzęcymi czy roślinnymi, to tu staramy się zawsze wpływ danego czynnika po stwierdzeniu jego działania ująć możliwie ściśle ilościowo i w tym celu odnosimy wynik otrzymany bądź do masy danego organu, bądź do masy osobnika, czy ostatecznie do ilości osobników w grę wchodzących. W podobnych zaś badaniach nad bakterjami poprzestajemy zazwyczaj na stwierdzeniu jakościowej strony zjawiska. A jednak, jak twierdzi Rubner (14), metoda badań fizjologicznych musi być taka sama, a przynajmniej

podobna zarówno dla organizmów wyższych, jak i niższych. Przy obecnym stanie techniki mikrobiologicznej nie można badać zjawisk u oddzielnych komórek bakteryjnych. Wielkie trudności doświadczalne następcza też posługiwanie się wymierzalnemi masami hodowli bakterji w celu następnego obliczenia wielkości efektu, przypadającego na jednostkę masy bakterji. Natomiast obliczenie ilości bakterji, powodujących pewien efekt zbiorowy, wymierzalny, jest dość łatwe. Znając zaś efekt zbiorowy i ilość komórek, które go wywoływały, określamy średnią sprawność komórki — *l'activité de la cellule* — jak ją nazwał Duclaux (6).

Niewątpliwie liczne zjawiska znalazłyby znacznie lepsze, pełniejsze częstokroć, wyjaśnienie, gdyby przy ich badaniu uwzględniano stopień rozwoju danej kultury. Trzeba jednak zauważyć, że stosowanie metod obliczania bakterji żywych, czynnych, jest niekiedy słuszne i dopuszczalne w początkowych tylko stadiach hodowli, kiedy to w kulturze przeważa rozwój bakterji, a stosunkowo nieznaczne jeszcze jest obumieranie komórek.

Opis metody.

Bakterja. Szczep *Bact. prodigiosum*, na którym przeprowadzono poniższe doświadczenia, pochodził ze zbiorów pracowni mikrobiologicznej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Pożywka. Pożywka była możliwie prosta i zawierała: 1% peptonu Witte'go, 0.5% NaCl i wodę wodociągową. Pożywki tej używano w ilości 40 cm³ w kolbkach pojemności 50 cm³.

Stężenie jonów wodorowych. Otrzymywano je przez dodatek HClⁿ/₁ lub NaOHⁿ/₁ w odpowiedniej ilości. Stężenie *H*⁺ wyznaczano na drodze elektrometrycznej zapomocą elektrody chinhydronowej (szczegóły w pracy W. Moycho (12)). W wypadkach większej zasadowości, gdzie metoda chinhydronowa nie daje dostatecznej pewności, kontrolowano stężenie *H*⁺ metodą kolorymetryczną zapomocą barwików Clark'a i Lubs'a (4). Ponieważ badane płyny były niekiedy mętne i zabarwione, więc przy oznaczaniu kolorymetrycznem stosowano także komparator Walpol'a.

Zakażanie. Zakażanie odbywało się przez wprowadzenie do serji pożywek w kolbkach po jednej kropli 12 do 24-godzinnej kultury *Bact. prodigiosum*. Pożywka tej kultury wyjściowej składała się z wody peptonowej, MgSO₄ i asparaginy. Po zakażeniu kulturę przechowywano w termostacie w t^o 22.5^o—23.5^o C.

Obliczanie rozwoju kultury. Istnieją dwie metody obliczania ilości komórek bakteryjnych: 1) Bezpośrednie obliczanie ilości

komórek, zawartych w pewnej objętości kultury, po przeniesieniu ich na daną powierzchnię i wnioskowanie z tej gęstości powierzchniowej, t. j. ilości komórek na jednostce powierzchni, o rozwoju kultury. 2) Określanie ilości żywych komórek w pewnej objętości kultury po przeniesieniu jej do żelatyny na płytkach Petri'ego przez obliczanie kolonii tam powstałych.

W badaniach niniejszych stosowano drugą metodę. W tym celu wprowadzano określoną objętość odpowiednio rozcieńczonej kultury *Bact. prodigiosum* do żelatyny, a po skłóceniu wylewano żelatynę na szalki Petri'ego. Szalki pozostawiano w ciągu 48 godzin w t^0 22·5—23·5 C, poczem obliczano ilość kolonii.

Liczby podane w doświadczeniach oznaczają w milionach ilość bakterij w $0\cdot1\text{ cm}^3$ kultury. Przy starannem operowaniu błąd w 2-ch równoległych doświadczeniach wahał się około 5%.

Występowanie barwika. W pracach dawniejszych ilość występującego barwika zdawała się być miarą rozwoju kultury *Bact. prodigiosum*; o ilości zaś prodigiozyny w poszczególnych kulturach wnoszono ze stopnia zabarwienia tych kultur. Podług Gorbacha (7) jednak najobfitsze występowanie prodigiozyny z jednej strony, a najintensywniejszy rozwój kultury — z drugiej, wymagają różnych stężeń $H^{\cdot}$.

Chwilę pojawiania się prodigiozyny poznajemy po występowaniu drobnych ziarenek różowych na pęcherzykach powietrza u powierzchni płynu, najczęściej koło martwych komórek bakterij. Z czasem ilość ziarenek się zwiększa, zabarwiając naprzód powierzchnię, a potem stopniowo i cały płyn pożywki. W doświadczeniach poniższych zasób barwika, dostrzegalny w chwili powstania, oznaczano +; większy zasób, powodujący zabarwienie powierzchni płynu, oznaczano ++; zaś silniejsze zabarwienia głębszych warstw + + +, ewent. + + + +. Stadja, w których brak zabarwienia, oznaczano przez —.

Część doświadczalna.

Tablice poniższe zawierają dwie serie doświadczeń równoległych. Początkowe stężenia jonów H w obrębie tych seryj wahały się od $pH = 3\cdot75$ do $pH = 8\cdot95$. Zakażenia dokonywane były równocześnie i jednakowo w obrębie tejże serji; przechowywanie hodowli odbywało się także w jednakowych warunkach.

Na podstawie poniższych danych doświadczalnych wysnuć można pewne wnioski, dotyczące: 1) zmiany stężeń $H^{\cdot}$ w pożywkach pod wpływem hodowli *Bact. prodigiosum*, 2) przebiegu rozwoju tej ho-

Serja I.

Przebieg rozwoju *Bact. prodigiosum* w różnych początkowych pH . (Marche du développement de *Bact. prodigiosum* dans les milieux de différents pH initiaux).

stężenie H^+ } = pH ; rozwój kultury } = R . prodigiozyna } = P_r
(concentration H^+) (développement de la culture) (prodigiosine)

	Początkowe pH (pH initial)		O b s e r w a c j a p o d n i a c h (O b s e r v a t i o n a u b o u t d e)							
			1	2	3	4	6	10	14	16
1.	3·90	pH R . P_r .	3·90 — —	4·00 — —	4·00 — —	4·00 — —	4·0 — —	— — —	— — —	— — —
2.	4·25	pH R . P_r .	4·28 0·38 —	4·30 4·4 —	4·45 5·9 —	4·71 7·0 —	5·85 10·6 ?	7·54 11·1 ++	8·15 5·6 ++++	8·3 3·6 ++++
3.	5·05	pH R . P_r .	5·65 12·0 —	6·52 28·5 ?	6·98 31·2 +	7·32 12·6 ++	7·97 8·0 +++	8·45 4·8 ++++	8·45 11·0 ++++	8·48 1·9 ++++
4.	6·17	pH R . P_r .	6·67 13·0 —	6·95 29·0 —	7·18 36·2 +	7·32 16·1 ++	7·92 9·7 +++	8·45 — ++++	— — —	— — —
5.	7·03	pH R . P_r .	7·17 14·8 —	7·25 40·2 —	7·40 44·5 +	7·50 31·2 ++	7·97 8·5 +++	8·43 6·8 ++++	8·45 10·3 ++++	8·46 2·7 ++++
6.	7·60	pH R . P_r .	7·55 14·1 —	7·55 40·0 —	7·65 42·3 ?	7·72 38·1 +	8·13 4·5 +++	8·43 — ++++	— — —	— — —
7.	7·98	pH R . P_r .	7·85 11·7 —	7·81 32·6 —	7·82 35·4 —	7·86 36·0 +	8·10 7·2 ++	8·43 6·4 +++	8·50 11·4 +++	8·50 3·1 +++
8.	8·52	pH R . P_r .	8·10 8·5 —	7·98 29·0 —	7·95 37·6 —	8·08 38·0 ?	8·18 17·5 +	8·48 7·5 ++	8·46 19·1 ++	8·48 3·9 ++
9.	8·95	pH R . P_r .	8·96 — —	— — —	— — —	8·3 — —	8·33 13·6 —	— — —	— — —	— — —

Liczby wskazujące rozwój kultury (R) oznaczają w milionach ilość żywych bakterij w 0·1 cm³ hodowli. (Les chiffres concernant le développement de la culture (R) indiquent en millions les nombres de bactéries vivantes dans 0·1 cc de la culture).

dowli w ośrodkach o różnych pH początkowych, 3) występowania prodigiozyny.

1. Zmiana pH pod wpływem hodowli *Bact. prodigiosum*. Obserwując stężenie H^+ w ciągu rozwoju kultury *Bact. prodigiosum*,

Serja II.

Przebieg rozwoju *Bact. prodigiosum* w różnych początkowych pH . (Marche du développement de *Bact. prodigiosum* dans les milieux de differants pH initiaux).

stężenie H^+ } = pH ; rozwój kultury } = R . prodigiozyna } = Pr .
(concentration H^+) } (développement de la culture) } (prodigiosine) }

	Początkowe pH (pH initial)		O b s e r w a c j a p o d n i a c h (O b s e r v a t i o n a u b o u t d e)							
			$\frac{1}{2}$	2	3	4	7	11	14	16
1.	3·80	pH R . Pr .	3·75 — —	3·76 — —	3·74 — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
2.	4·45	pH R . Pr .	4·58 2·4 —	5·25 7·9 —	6·02 22·1 —	6·50 27·2 ?	7·50 8·0 ++++	8·35 3·3 ++++	8·47 9·5 ++++	8·50 1·9 ++++
3.	5·50	pH R . Pr .	6·02 8·1 —	6·69 24·2 —	6·98 40·2 ?	7·15 44·2 +	7·85 9·5 ++++	— — —	— — —	— — —
4.	6·75	pH R . Pr .	6·93 11·6 —	7·25 29·1 —	7·40 50·2 ?	7·50 48·8 +	7·90 11·2 ++++	8·47 3·6 ++++	8·53 12·3 ++++	8·55 1·4 ++++
5.	7·56	pH R . Pr .	7·60 10·6 —	7·60 32·0 —	7·62 51·6 ?	7·65 50·2 +	8·05 9·3 +++	— — —	— — —	— — —
6.	8·02	pH R . Pr .	7·82 6·7 —	7·75 23·4 —	7·70 41·3 —	7·75 46·1 ?	8·12 14·5 ++	8·50 6·1 +++	8·52 12·2 +++	8·52 0·5 +++
7.	8·60	pH R . Pr .	8·50 ? —	8·32 8·1 —	7·95 18·9 —	7·90 25·3 —	8·22 32·5 ?	8·42 38·1 +	— — —	— — —
8.	8·98	pH R . Pr .	8·80 — —	8·60 ? —	— ? —	8·44 0·03 —	8·22 8·5 —	8·52 — ?	8·53 13·3 +	— — —

spostrzegamy jego swoistą zmienność. Stężenie H^+ w ośrodku kwaśnym spada (np. $pH = 4·0 \rightarrow pH = 8·5$), w zasadowym — początkowo rośnie, aby następnie również się zmniejszyć (np. $pH = 8·5 \rightarrow 7·8 \rightarrow 8·5$). W przypadku wyjściowego $pH = 7·5$ odczyn w pierwszych stadiach rozwoju kultury nie ulega zmianie. Kresowe stężenie H^+ , do którego zdążają odczyny środowisk zarówno początkowo kwaśnych, jak obojętnych, czy zasadowych, leży około $pH = 8·6$; powyższa wartość pH nie ulega prawie zmianie po pół, a nawet całym roku. Naturalnie w ośrodkach zbyt kwaśnych ($pH < 4$), albo nadmiernie zasadowych

($pH > 9$), *Bact. prodigiosum* nie rozwija się, a odczyn ośrodka nie ulega zmianie. Zmiany więc odczynu zależne są od wartości pH początkowej. Przebieg zmiany odczynu pożywki peptonowej pod wpływem rozwijającej się hodowli *Bact. prodigiosum* przedstawia wykres Nr. 1 (doświadczenia 2, 5 i 8 w serii I).

Podobne wyniki znajdujemy w pracy Sierakowskiego (17), który, zdaje się pierwszy, ściślej obserwował to zjawisko, hodując szereg bakterij, a zwłaszcza *Bact. Coli*, na pożywkach buljonowych, i określając H^+ metodą kolorymetryczną.

Przyczyny zmiany pH nie są dotąd wyjaśnione. Stwierdzona obecność NH_3 w pożywkach peptonowych z *Bact. prodigiosum*, czy przez destylację z CaO , czy z pomocą odczynnika Nessler'a, uzasadnia w pewnej mierze zmniejszenie się kwasowości pożywki. Dla wyjaśnienia natomiast zmian w ośrodkach zasadowych brak nam dotąd pewniejszych podstaw.

2. Rozwój kultury *Bact. prodigiosum* i warunki tego rozwoju. Ogólny przebieg rozwoju kultury *Bact. prodigiosum* niezależnie od odczynu ośrodka odbywa się w sposób następujący. W fazie początkowej, o ile tylko odczyn pożywki nie jest zbyt kwaśny lub zbyt zasadowy (a więc w granicach $5 < pH < 8$), rozwój bakterij odbywa się bardzo intensywnie, gdy równoczesny zanik komórek niewątpliwie jest stosunkowo znikomy. W miarę zbliżania się do maksimum rozwoju kultury szybkość przyrostu nowych komórek zmniejsza się, gdy szybkość zaniku ich stopniowo rośnie. W fazie najwyższego rozwoju, t. j. w chwili, gdy maksymalna ilość żywych komórek utrzymuje się na stałym poziomie, powyższe szybkości stają się równe. Wkrótce po osiągnięciu tego maksimum ilość żywych komórek znacznie spada, a więc szybkość zanikania wybitnie przeważa nad szybkością powstawania. Po pewnym czasie zanika przewaga 2-go procesu nad 1-szym, ilość żywych komórek utrzymuje się na stałym niższym poziomie. Przy dalszem badaniu w hodowli 10—14-dniowej zauważyć można powtórna przewagę nowopowstających komórek nad ginącymi, a stąd drugie, mniejsze maksimum, które zresztą prędko zanika.

Przebieg rozwoju hodowli *Bact. prodigiosum* z uwzględnieniem różnych stężeń H^+ przedstawia wykres Nr. 2 (doświadczenia 2, 4, 6 serii II).

Powyższy ogólny opis rozwoju kultury *Bact. prodigiosum* uzupełniają następujące bliższe wyjaśnienia.

a) Rozpiętość granic pH dla rozwoju *Bact. prodigiosum*. Rozwój ten odbywać się może, jak widać ze skrajnych doświadczeń

obu seryj, w ośrodkach peptonowych, w których $3.9 < pH < 9$, gdy według Dernby'ego (5) rozpiętość ta w ośrodkach buljonowych dla tejże bakterji nie przekracza $5 < pH < 8$.

Wykres Nr. 1.

Zmiany pH pod wpływem *Bact. prodigiosum*: a) pożywka o pH początkowym = 5.05; b) o pH początkowym = 7.03; c) o pH początkowym = 8.52.

(Changement du pH sous l'influence de *Bact. prodigiosum*: a) milieu au pH initial = 5.05; b) au pH initial = 7.03; c) au pH initial = 8.52).

b) Optimum pH dla początkowego rozwoju *Bact. prodigiosum*. Najobficiej początkowo rozwija się *Bact. prodigiosum* w pożywkach obojętnych, czy słabo zasadowych ($pH = 7-7.5$);

Wykres Nr. 2.

Przebieg rozwoju *Bact. prodigiosum* w pożywkach: a) o pH początkowym = 4.45; b) o pH początkowym = 6.75; c) o pH początkowym = 8.02. (Marche du développement de *Bact. prodigiosum* dans les milieux. a) au pH initial = 4.45; b) au pH initial = 6.75; c) au pH initial = 8.02).

Na osi rzędnych — w milionach żywych bakterij w 0.1 cm³ hodowli. (Sur l'ordonné — les nombres en millions de bactéries vivantes dans 0.1 cc de la culture).

w pożywkach bardziej kwaśnych lub bardziej zasadowych ($pH = 4-5$, lub $pH = 8.5-9$), rozwój początkowy jest słabszy. O optimum pH dla rozwoju bakterji wnosimy ze stopnia rozwoju bakterji w pierwszej fazie, kiedy stężenie H^+ nie uległo jeszcze znaczniejszej zmianie. Z doświadczeń 5-go i 6-go serii I, oraz 4-go i 5-go serii II widać, że dla rozwoju *Bact. prodigiosum* wspomniane optimum wynosi $pH = 7-7.5$. Dernby (5) podaje dla tejże bakterji w buljonie peptonowym optimum $pH = 6-7$.

c) Zależność między maksymalnym rozwojem kultury a początkowym pH . W dalszych fazach najsilniejszy rozwój osiąga hodowla w pożywkach o początkowym $pH = 5.5-8.5$, jak widać z doświadczeń 4, 5, 6 i 7 serii I, oraz 3, 4, 5 i 6 serii II. W ośrodkach początkowo bardziej kwaśnych, czy bardziej zasadowych, maksimum rozwoju jest niższe.

d) Faza przemożnego zamierania bakteryj. Jak widać z wykresu Nr. 2, wyobrażającego przebieg rozwoju hodowli, po fazie najwyższego rozwoju następuje okres wybitnego zamierania komórek. Zjawiska tego nie przypisujemy wpływowi chwilowego stężenia H^+ , gdyż może ono zachodzić, jak widać z doświadczeń, w granicach pH dość rozległych. Dla wyjaśnienia tego wymierania nasuwają się przede wszystkim następujące przypuszczenia: wyczerpanie się pożywki, nadmierne nagromadzenie szkodliwych produktów przemiany materji, lub wreszcie łączne działanie obu tych czynników. Dla wyjaśnienia tej sprawy wykonano następujące doświadczenia (Serja III).

Zakażano równocześnie i jednakowo dwie identyczne pożywki: jedną pozostawiono w spokoju, drugą wielokrotnie kłócono. Po trzech dniach zbadano stan obu kultur.

Serja III.

Wpływ mieszania pożywki na rozwój *Bact. prodigiosum*. (Influence de la mixtion du milieu sur le développement de *Bact. prodigiosum*).

Początkowe $pH = 4.8$ (pH initial)		Początkowe $pH = 5.1$ (pH initial)	
Kultura w spokoju (Culture au repos)	Kultura kłócona (Culture remuée)	Kultura w spokoju (Culture au repos)	Kultura kłócona (Culture remuée)
pH 6.75	6.60	6.83	6.70
R. 17.2	32.3	21.0	38.0
Pr. ++	—	++	—

Jak wynika z tych doświadczeń, rozwój hodowli kłóconej jest prawie dwukrotnie silniejszy aniżeli hodowli w spokoju. Tak więc

powodem wczesnego zamierania komórek bakteryjnych nie jest ani ogólne wyczerpanie substancji odżywczej ośrodka, ani też ogólne nadmierne nagromadzenie produktów przemiany materji, hamujących rozwój bakterji, jak np. autotoksyn.

Wbrew panującym poglądom, według których *Bact. prodigiosum* jest anaerobem fakultatywnym, zachowanie się tej bakterji w doświadczeniach serii III pozwala przypuszczać, że *Bact. prodigiosum* rozwija się właśnie dla swych wymogów tlenowych raczej u wolnej powierzchni pożywki, a nie równomiernie w całym ośrodku. Bakterje, rozwijające się u wolnej powierzchni pożywki, utrudniają odnawianie się zużytego tlenu w głębi, stąd rychlejsza śmierć komórek w głębszych warstwach. Kłócąc hodowle, z jednej strony wprowadzamy tlen do warstw głębszych, z drugiej strony udostępniamy niewyczerpane substancje pożywki, a także, być może, rozpraszamy po całej masie szkodliwe produkty przemiany materji, nadmiernie nagromadzone lokalnie.

Taka interpretacja roli tlenu dla tej bakterji znajduje potwierdzenie w doświadczeniach serii IV-ej.

Serja IV.

Rozwój kultury kłóconej wobec tlenu i w braku tlenu. (Développement de la culture remuée en présence du (O_2) et en absence du (O_2).

Observation au bout de	Początkowe $pH = 4.4$ (pH initial)						Początkowe $pH = 6.9$ (pH initial)					
	A			B			A_1			B_1		
	atm. zwykła (atm. ordinaire) pH R. Pr.			atm. zwykła (atm. ordinaire) pH R. Pr.			atm. zwykła (atm. ordinaire) pH R. Pr.			atm. zwykła (atm. ordinaire) pH R. Pr.		
2	6.78	20.0	—	6.8	19.0	—	7.6	39.0	—	7.72	40.0	—
	atm. zwykła (atm. ordinaire)			atm. beztlén. (atm. sans O_2)			atm. zwykła (atm. ordinaire)			atm. beztlén. (atm. sans O_2)		
4	—	30.0	—				—	41.5	+			
5	—	35.0	+				—	36.5	++			
6	—	11.4	++++				—	20.0	++++			
7	7.5	10.2	++++	6.88	9.8	—	8.10	11.5	++++	7.7	1.7	

Z dwu podobnych hodowli A i B oraz A_1 i B_1 , otrzymanych w sposób zwykły przy dostępie powietrza, po określeniu ich stanu rozwoju, jedną z nich A (A_1) pozostawiamy nadal w warunkach zwykłych, gdy drugą B (B_1) umieszczamy w atmosferze beztlenowej. W tym celu kulturę w dostatecznie szerokiej probówce wprowa-

dzano do innej, szerszej, z pyrogallem i KOH i tę hermetycznie zamykano. Obie równoległe kultury kłócono w jednakowy sposób. Zwykle pomiary wykonywano nad hodowlą (A i A_1), zaś nad beztlenową B (B_1) oczywiście po skończonem doświadczeniu.

Z doświadczeń serii IV widać, że w warunkach zwykłych tlenowych (A i A_1) stężenie H^+ w kulturze kłóconej zmienia się wyraźnie ($6.78 \rightarrow 7.7$ wzgl. $7.6 \rightarrow 8.1$); w tymże czasie w kulturach beztlenowych (B i B_1) również kłóconych, większej różnicy w pH nie widać ($6.8 \rightarrow 6.88$, wzgl. $7.72 \rightarrow 7.70$). Tak więc zmiana stężeń H^+ , wybitna osobiście w ośrodkach kwaśnych, w kulturach kłóconych w atmosferze beztlenowej (B i B_1) nie zachodzi, co możnaby uważać za objaw słabej przemiany materji w tych warunkach.

Co dotyczy kultury kłóconej w zwykłych warunkach tlenowych (A i A_1), to jak widać, przebieg rozwoju jest normalny; w ośrodku kwaśnym, czy obojętnym, po fazie wzrostu następuje zanik. W hodowlach beztlenowych (B i B_1) widoczny jest tylko zanik.

Może tu jednak powstać przypuszczenie, że hodowle beztlenowe, niekontrolowane z konieczności w ciągu pewnego okresu czasu, mogły również przejść przez fazę wzrostu, a następnie uległy zanikowi i ten ostatni etap wyrażają liczby podane (9.8 i 1.7). Przypuszczenie to jednak traci wszelką podstawę w świetle następującego doświadczenia (serja V).

Dwie identyczne pożywki zakażano w jednakowy sposób i natchmiast jedną z nich wprowadzano, jak poprzednio, do atmosfery beztlenowej (pyrogallol + KOH), pozostawiając drugą w atmosferze zwykłej.

Serja V.

Wpływ tlenu na rozwój *Bact. prodigiosum*. (Influence de l'oxygène sur le développement de *Bact. prodigiosum*).

Początkowe $pH = 5.65$ (pH initial)	
Kultura + O_2 Culture + O_2	Kultura - O_2 Culture - O_2
Stan po 18 dniach Etat au bout de 18 jours	$pH = 5.7$
$pH = 8.3$	Pożywka przezroczysta, bezbarwna. (Milieu transparent, incolore).
Kultura silnie mętna, czerwona, obfity osad. (Culture fortement trouble, rouge, dépôt abondant)	

Jak widać z serii V-tej doświadczeń *Bact. prodigiosum*, a przynajmniej szczep użyty, w atmosferze beztlenowej rozwijać się nie może.

Doświadczenia serii III-ej, IV-ej i V-ej doprowadzają do następujących wyników:

1. *Bact. prodigiosum* jest bezwzględny aerobem, a nie fakultatywnym anaerobem, za którego dość powszechnie się go uważa. Lehmann (II), Baumgärtel (1) uważają *Bact. prodigiosum* za anaeroba fakultatywnego, chociaż pierwszy z tych autorów przytacza pracę Samkova (15), według której, bakteria ta w atmosferze wodoru i w obecności pyrogallolu rozwijać się nie może. Zauważyć trzeba jednak, że Bergey (2) wymienia *Bact. prodigiosum* jako aeroba.

2. W cyklu rozwojowym *Bact. prodigiosum* pierwszy okres zaniku nie jest spowodowany ogólnym brakiem substancji odżywczych w hodowli, ani też ogólnym nagromadzeniem się produktów przemiany materii, hamujących rozwój, ale głównie skutkiem wyczerpania się tlenu w głębszych warstwach pożywki.

e) Faza ponownego rozrostu (drugie maksimum) a autoliza. Po fazie nagłego zamierania bakterii (punkt d, wykres 2), spowodowanego brakiem tlenu, następuje okres powolnego zaniku, gdzie już nie brak tlenu odgrywa główną rolę. Dowodzą tego stany kultur A i A₁ serii IV-ej, które, mimo dopływu tlenu przez kłócenie, ulegają stopniowemu zanikowi. Przyczyną tego zaniku nie są również gromadzące się szkodliwe produkty przemiany materii, przeczy bowiem temu występowanie ponownego rozrostu (drugiego maksimum). Poprzedzający to maksimum zanik bakterii przypisać więc należy głównie zużyciu się pożywki; ponowny zaś rozrost hodowli umożliwił pojawienie się nowych substancji odżywczych wskutek autolizy komórek martwych pod wpływem proteaz, ujawniających swą działalność proteolityczną wraz ze śmiercią komórki.

3. Występowanie prodigiozyny. Zauważyć przedewszystkiem trzeba, że w normalnych warunkach doświadczeń (Serja I i II), barwik, niezależnie od początkowego pH pożywki, występuje zawsze, o ile oczywiście stężenie H⁺ pozwala na rozwój *Bact. prodigiosum*. Zjawia się on najprędzej w pożywkach, gdzie rozrost bakterii był najszybszy, a więc w ośrodkach o pH zbliżonym do obojętnego; nieco później występuje w ośrodkach słabo kwaśnych (pH = 5·0—6·5); natomiast w ośrodkach mocno kwaśnych (pH = 4·0—5·0) jak i silniej zasadowych (pH = 8·0—9·0), to opóźnienie jest zupełnie wyraźne. Stężenie H⁺ ośrodka prócz wpływu na szybkość występowania barwika ma jeszcze wpływ na kolor jego: w ośrodkach początkowo kwaśnych, obojętnych, słabo zasadowych (pH = od 4·0 do prawie

8·0) prodigiozyna jest koloru wyraźnie czerwonego; w ośrodkach silnie zasadowych ($pH = 8\cdot0 - 9\cdot0$) zabarwienie jest raczej żółtawe.

Rozpatrując przebieg rozwoju kultury *Bact. prodigiosum* w doświadczeniach serji I, II i IV-ej, zauważyć można zawsze powtarzający się fakt, że kultura, początkowo bezbarwna, zabarwia się dopiero później. Moment dostrzegalnego występowania prodigiozyny zbiega się stale dopiero z fazą najsilniejszego rozwoju kultury. Wobec tego nie można uważać prodigiozyny za normalny produkt przemiany materji żywej komórki. A ponieważ właśnie od chwili osiągnięcia swego maksymalnego rozwoju ilość komórek zamierających w hodowli wzrasta niezmiernie szybko (punkt *d*), więc narzuca się przypuszczenie, że powstawanie prodigiozyny ściśle się wiąże z autolizą martwych komórek.

Doświadczenia zaś z hodowlami beztlenowemi (*B* i *B*₁ serji IV) dowodzą, że dla wytworzenia prodigiozyny obok procesu autolizy konieczna jest jeszcze obecność tlenu: bardzo silnemu spadowi rozwoju (z 19 na 9·8 oraz z 40 na 1·7) w atmosferze beztlenowej nie towarzyszy pojawienie się prodigiozyny, gdy w równoległych hodowlach tlenowych (*A* i *A*₁) zabarwienie jest bardzo silne.

Co dotyczy mechanizmu tworzenia się prodigiozyny, to podobnie, jak u wielu barwików w świecie roślinnym i zwierzęcym, możnaby przypuścić, że powstaje ona też przy udziale odpowiednich enzymów.

Podług Oppenheimer'a (13) liczne barwiki w organizmie zwierzęcym powstają wskutek działania właściwych enzymów na tyrozynę, dwuoksyfenilalaninę, adrenalinę i t. p. chromogeny; w świecie roślinnym zaś pod działaniem enzymów-fenolaz, jak oksydazy i peroksydazy, na fenolowe chromogeny.

W przypadku prodigiozyny działanie odpowiednich enzymów, oksydaz, doprowadzające do stałego zabarwienia, występowałyby dopiero po śmierci komórek przy ich autolizie. Potwierdza to fakt, że mieszanie hodowli bakteryjnej (dośw. serji III), nie zmieniając prawie takich czynników jak stężenie *H*⁺, ale przedłużając jedynie czas trwania rozwoju, a odsuwając fazę masowej śmierci, opóźnia temsamem pojawienie prodigiozyny.

Niektóre z powyższych oksydaz cechuje według Oppenheimer'a (13) wybitna nietrwałość, stąd też wielkie trudności nastrocza wyosobnienie tych oksydaz. Peroksydazy są wprawdzie trwalsze od właściwych oksydaz i przeważnie towarzyszą im, ale trudniej mogą ujawnić swe działanie, gdyż wymagają obecności H₂O₂.

Dla utworzenia się prodigiozyny przy autolizie komórki wchodziłyby normalnie w grę przy śmierci „naturalnej” oksydazy wła-

ściwe. W wypadkach śmierci sztucznej, spowodowanej działaniem takich czynników, jak toluol, eter, chloroform lub silne ogrzewanie (70°C) przy stężeniach $H^{\cdot}$ w granicach $pH = 4.0-9.0$, jak liczne doświadczenia wskazują, prodigiozyna nie występuje. Przypisać to należy prawdopodobnie wyżej wspomnianej nietrwałości właściwych oksydaz: z chwilą sztucznego zniszczenia komórki enzymy te ulegają same zniszczeniu lub też, być może, nie mogą tylko przejawić swego działania.

Jeżeli jednak do hodowli *Bact. prodigiosum*, młodej, bezbarwnej zabitej w jeden z powyższych sposobów, dodać wody utlenionej, to zabarwienie różowe występuje dość regularnie, co wskazywałoby na działanie peroksydaz. Zresztą doświadczenia, robione z świeżo przygotowanym wyciągiem gwajakum w obecności zubożonej wody utlenionej, potwierdzają występowanie jakkolwiek słabe peroksydaz w hodowli.

Niektóre z przytoczonych doświadczeń (obecność peroksydaz, wpływ wody utlenionej na zabarwienie, konieczność tlenu dla wystąpienia barwika) wskazują, że powstawanie prodigiozyny z chromogenu polega na utlenieniu tego ostatniego przy udziale odpowiednich enzymów.

O naturze jednak chemicznej samego chromogenu trudno powiedzieć coś stanowczego. Wiemy wszakże, że liczne barwiki roślinne i zwierzęce powstają ze związków, które, czy to wskutek utraty cząsteczki wodoru, czy też wskutek kondensacji dają ciała barwne. Być może chromogen prodigiozyny należy do tejże kategorii ciał.

Streszczenie wyników.

1. Istnieje wzajemne oddziaływanie między stężeniem $H^{\cdot}$ pożywki a rozwojem *Bact. prodigiosum*. Stężenia $H^{\cdot}$ w granicach od $pH = 4$ do $pH = 7.5$ pod wpływem rozwijającej się bakterii ulegają zmniejszeniu. Stężenia $H^{\cdot}$ w granicach od $pH = 7.5$ do $pH = 9$ pod wpływem bakterii początkowo rosną, a w następstwie maleją. Granicę, do której dążą końcowe stężenia $H^{\cdot}$, stanowi $pH = 8.6$.

2. Rozpiętość granic stężeń $H^{\cdot}$, w obrębie których odbywać się może rozwój *Bact. prodigiosum* w pożywce peptonowej, wynosi $pH = 4-9$.

3. Optimum początkowego stężenia $H^{\cdot}$ dla rozwoju *Bact. prodigiosum* w pożywce peptonowej wynosi $pH = 7-7.5$.

4. W rozwoju bakterii przy pH w granicach 5.0 do 8.0 występuje początkowo bardzo silny rozrost żywych komórek; wkrótce zaś

po osiągnięciu maksimum rozwoju zachodzi wybitna przewaga zamierających komórek nad nowopowstającymi.

5. Faza depresji w rozwoju spowodowana jest nie brakiem substancji odżywczych w pożywce, ani też nagromadzeniem się tam szkodliwych produktów przemiany materji, lecz niedostatecznym dopływem tlenu do głębszych warstw pożywki.

6. Tlen jest niezbędny dla rozwoju *Bact. prodigiosum*.

7. Po kilkunastu dniach hodowli (po 10-u do 14-u w warunkach przytoczonych doświadczeń) występuje powtórny, lecz znacznie słabszy, okres rozrostu bakterji. Ten przejściowy przyrost żywych komórek przypisać należy pojawieniu się nowych zasobów odżywczych, powstałych z autolizy martwych komórek.

8. Występowanie drugiego maksimum wskazuje, że poprzedzający je zanik rozwoju powstał skutkiem braku substancji odżywczych, a nie pod wpływem szkodliwych produktów przemiany materji.

9. Dostrzegalne występowanie prodigiozyny stale zbiega się z okresem maksymalnego rozwoju bakterji, silne zaś zabarwienie zjawia się wkrótce potem, w okresie masowego zamierania.

10. Mieszanie hodowli, które przedłuża rozwój bakterji, a odsuwa okres zamierania komórek, tem samem opóźnia występowanie prodigiozyny.

11. W młodych, bezbarwnych hodowlach po przeniesieniu ich do atmosfery beztlenowej prodigiozyna nie występuje pomimo masowego zamierania komórek.

12. Prodigiozyna nie występuje również w hodowlach zabitych toluolem, eterem, chloroformem, silniejszym ogrzewaniem (70° C), co związane jest prawdopodobnie ze zniszczeniem enzymów-oksydaz, powodujących utlenienie chromogenów, które powstają przy autolizie komórek.

13. Dodanie wody utlenionej do hodowli zabitej jednym z powyższych sposobów, powoduje pojawienie się prodigiozyny.

14. Obecność peroksydaz w hodowli *Bact. prodigiosum* stwierdzić się daje zapomocą wyciągu gwajaku z wodą utlenioną.

Pracę niniejszą wykonano w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego. Korzystam ze sposobności, aby złożyć serdeczne podziękowanie Prof. Dr. K. Bassalikowi za cenne wskazówki w czasie niniejszej pracy, zarówno jak i wyrazić głęboką wdzięczność Prof. Dr. S. Dziubałtowskiemu, którego życzliwa postawa umożliwiła mi przeprowadzenie powyższych badań.

Résumé.

Le but du présent travail c'était d'étudier:

1^o L'influence des différentes concentrations en H^+ sur la marche du développement de *Bact. prodigiosum*;

2^o le changement de la concentration elle-même en H^+ sous l'influence de *Bact. prodigiosum*;

3^o la dépendance éventuelle de la période de l'apparition de la prodigiosine du degré du développement de la culture.

Au cours de ce travail se posa la question du rôle de l'oxygène dans le développement de la bactérie.

Le milieu nutritif employé fut composé d'eau peptonée à 1^o/₁₀ avec addition de 0.5^o/₁₀ de NaCl.

Les concentrations appropriées en H^+ furent obtenues par l'addition de $HCl^{n/1}$ ou $NaOH^{n/1}$. La détermination de la concentration en H^+ fut faite par la méthode électrométrique avec une électrode à quinhydrone; dans les cas douteux les résultats furent vérifiés par la méthode colorimétrique.

Les cultures de la même série furent inoculées de la même façon, en même temps et conservées à la température de 22.5—23.5^o C.

Le degré du développement fut mesuré par le nombre des cellules vivantes dans 0.1 cc. du milieu de culture. Dans ce but une quantité bien définie de la culture, convenablement diluée, fut mélangée avec la gélatine. Le nombre des colonies qui apparurent corresponda à celui des cellules vivantes.

Les chiffres fournis correspondent aux cellules vivantes en million.

Il existe une dépendance entre la concentration en H^+ du milieu et le développement de *Bact. prodigiosum*. Les concentrations en H^+ , dans les limites du $pH = 4.0-7.5$, diminuent sous l'influence de la bactérie en développement. Les concentrations en H^+ , dans les limites du $pH = 7.5-9.0$, augmentent d'abord mais ensuite diminuent sous l'influence de la bactérie. La limite vers laquelle tendent les concentrations finales en H^+ , est représentée par le $pH = 8.6$ (la courbe 1).

Les limites des concentrations en H^+ des milieux peptonés, dans lesquels peut croître *Bact. prodigiosum* constitue le $pH^+ = 4.0-9.0$.

L'optimum de la concentration en H^+ dans le milieu peptoné, pour la même bactérie, est environ $pH = 7.0-7.5$.

Dans le cycle évolutif de la bactérie dans les différents pH^+ , se manifeste tout d'abord une forte croissance des cellules vivantes;

quand le développement atteint son maximum, le nombre de cellules disparaissantes augmente rapidement et peu après surpasse de beaucoup le nombre de cellules vivantes (la courbe 2).

Cette disparition des bactéries en masse est causée non pas par le manque de substance nutritive ou par l'accumulation des produits nuisibles, mais par l'insuffisance de l'oxygène dans les couches plus profondes du milieu (expériences de la série III et IV).

L'oxygène est nécessaire pour le développement de *Bact. prodigiosum* (expériences de la série V).

Après quelques jours (10 à 14 jours dans les conditions d'expérimentation) il apparaît une seconde période de la croissance plus active. Il faut attribuer cet accroissement passager à l'apparition des substances nutritives nouvelles, provenant de l'autolyse des cellules.

La présence du deuxième maximum indique, que la diminution du développement qui le précède, est causée par le manque de la substance nutritive et non pas par les produits nuisibles, provenant de l'échange de la matière.

Dans les limites du $pH = 5.7-8.0$ la concentration en H^+ ne paraît pas avoir une influence plus manifeste sur la formation de la prodigiosine.

La présence perceptible de la prodigiosine coïncide régulièrement avec la période du développement maximale de la bactérie, la période à laquelle le nombre des cellules disparaissantes devient de plus en plus fort.

La prodigiosine ne paraît pas être un produit de l'échange de la matière de la bactérie vivante; c'est un produit de la mort, de l'autolyse de la cellule.

Ainsi la mixtion de la culture qui prolonge la vie et éloigne la période de la necrobiose des cellules en masse, retarde par cela l'apparition de la prodigiosine.

Dans les cultures jeunes et incolores qui sont placées dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, la prodigiosine n'apparaît pas, malgré la disparition des cellules en masse.

La prodigiosine n'apparaît pas non plus dans les cultures tuées par le toluol, l'éther, le chlorophorme et l'échauffement (à $70^{\circ}C$).

L'addition de l'eau oxygénée à des cultures tuées, par un des procédés cités plus haut, détermine l'apparition de la prodigiosine.

Les peroxydases, quoique en quantité minime, peuvent être mises en évidence par le bleuissement de la teinture de guaïac en présence de l'eau oxygénée.

Literatura.

1. Baumgärtel, Tr, Grundriss der theoretischen Bakteriologie. Berlin, 1924.
2. Bergey, D. H. Manual of determinative Bacteriology. II. ed. Baltimore 1925.
3. Beyerinck: Die Lebensgeschichte einer Pigmentbakterie. Bot. Zeit. 49/724 (1891).
4. Clarck. The determination of Hydrogen — Ions. 2 ed. 1922.
5. Dernby. a) La concentration opt. en ions *H* favorisant le développement de certains microorganismes. An. Inst. Pasteur. 35 277 (1921); b) Über einige extra cellulär-wirkende Bakterien-Proteasen. Bioch. Zeitschr. 126/105 (1921).
6. Duclaux: Traité de microbiologie t. IV, p. 328 (1901).
7. Gorbach, G. Zur Kenntnis d. Farbstoffes d. *Bacil. prodigiosus*. Centralbl. f. Bakteriologie Abt. II, 79/26 (1929).
8. Griffiths: C. r. Ac. Sc. 115/321 (1892).
9. Hefferan, M. A comparative and exp. stud. of bac. producing red. pigment. Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, 11/466 (1903).
10. Lehmann, K. B. Bakteriologie. II vol. 459 (1927).
11. Michaelis, L. Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.
12. Moycho, W. Sur l'action des enzymes protéolytiques bactériennes. C. R. Ac. Sc. 187/681 (1928).
13. Oppenheimer, C. Lehrbuch d. Enzyme. Leipzig. 1927.
14. Rubner, M. Energieverbrauch im Leben d. Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene 48/284 (1904).
15. Samkow, S. Zur Physiologie d. *Bact. prodigiosus*. Centralbl. f. Bakteriologie 11/305 (1904).
16. Scheurlen. Geschichtliche u. exp. Studien über d. *Prodigiosus*. Arch. f. Hygiene 26 I. (1896).
17. Sierakowski, St. Über Veränderungen der *H*-ionenkonzentration in den Bakterienkulturen u. ihr Entstehungsmechanismus. Bioch. Zeitschr. 151/15 (1924).
18. Sörensen, S. P. L. Enzymstudien II. Bioch. Zeitschr. 21/131 (1909).
19. Sullivan. Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments. Journ. of med. Res. 14/109 (1905).
20. Wrede, Fr. u. Hettche, Otto. Über das *Prodigiosin*, den roten Farbstoff des *Bacil. prodigiosus*. Ber. d. deut. chem. Gesellsch. 62 2678 (1929).