ZOFJA SEMBRAT

Z Instytutu Weterynarji
i Medycyny Doświadczalnej.
Kraków.

(wpłynęło 12. VII 34 r.)

O WPŁYWIE KOFEINY NA ZMIANY MORFOLOGICZNE BAKTERYJ BRODAWKOWYCH.

(Influence de la caféine sur les modifications
morphologiques des bacteries nodulaires).

Bacterium radicola w stanie wolnym w ziemi występuje jako krótka laseczka. Jak podaje Thornton i Gangulee (28) podlega ona pewnemu cyklowi rozwojowemu, przechodząc trzy stadia: laseczki niezakuolizowanej, kokków i laseczki z wakuolami. Wewnątrz brodawek korzeniowych laseczki przekształcają się w bakteroidy i wówczas występuje symbioza pomiędzy rośliną motylkową a *B. radicola*. Prażmowski (21) na podstawie swych doświadczeń dochodzi do następujących wyników: (str. 104) „Wiązanie azotu wolnego i przerabianie go na związki organiczne uskuteczniają bakteryje, rośliny zaś motylkowe korzystają z tej fizjologicznej pracy bakteryj”. Wskazuje to na fakt, „że największa część nagromadzonego w nich (w brodawkach) azotu znajduje się w postaci bakteroidów czyli przeobrażonych bakteryj, które stanowią główną treść komórek wewnętrznego miększu brodawek”. Czasem spotyka się również brodawki zawierające tylko zwykłe laseczki, ale takie brodawki są bez znaczenia dla asymilacji azotu przez rośliny motylkowe (brodawki nieasymilujące, według Löhnisa) (13). Ponieważ, jak sądzono, tworzenie się bakteroidów jest ściśle związane z asymilacją azotu z powietrza, starano się wykryć czynniki wpływające na przekształcenie się laseczek w bakteroidy.

Jak wiemy pierwszym, który w czystej kulturze wyhodował i opisał bakterje wyosobnione z brodawek korzeniowych roślin motylkowych był Beijerinck (1888). Otrzymał on jednak w hodowli tylko laseczki, jak i szereg późniejszych autorów, którzy, jakkolwiek widzieli niejednokrotnie formy bakteroidalne, to nie wyhodowane przez siebie, lecz izolowane wprost z brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Według Zipfla (32) formy rozgałęzione spotykane przez szereg autorów w brodawkach starszych muszą być uważane za prawdziwe formy inwolucyjne takie, jakie wytwarzają też i inne bakterje w warunkach zewnętrznych niesprzyjających. Formy te zaś nie mają nic wspólnego z właściwymi bakteroidami, które przeciwnie są normalnymi formami rozwojowymi *B. radicola*.

Jednym z pierwszych autorów, który starał się otrzymać bakteroidy na sztucznym podłożu był Stutzer (26). Pożywka przez niego używana składała się z wodnego wyciągu nasion roślin motylkowych z dodatkiem różnych soli mineralnych lub cukrów. Dodatek soli mineralnych nie wpływał na tworzenie się bakteroidów; przy dodatku zaś $1\frac{1}{2}$ lub 1% sacharozy otrzymał bakteroidy, podobnie jak Mazé (17a), ale rzadko. Te, które widział były bardzo dobrze wykształcone. W końcu na podstawie swych doświadczeń dochodzi do wniosku, że tylko formy bakteroidalne, jeśli się takie znajdują w niezbyt młodych brodawkach korzeniowych, są przyczyną powstawania form rozgałęzionych na sztucznych podłożach.

Neumann (20) próbował na innych pożywkach niż Stutzer otrzymać formy rozgałęzione i w tym celu użył brodawek bobu, których treścią szczepił różne podłoża płynne, ale zawsze z wynikiem ujemnym. Za to udało mu się otrzymać formy rozgałęzione na takich podłożach jak: mocznik, wyciąg z roślin, z korzeni, z nasion bobu lub z ziemi. We wszystkich wypadkach zaobserwował zbliżone do ziarniaków drobne formy rozgałęzione.

Buchanan (5) stwierdza fakt bardzo doniosły, a mianowicie, że bakteroidy otrzymane ze sztucznych kultur oraz wyizolowane z brodawek korzeniowych, odznaczają się temi samymi kształtami u tych samych gatunków.

Zipfel (32) oraz Barthel (1) każdy osobno, starał się otrzymać bakteroidy na podłożu sztucznym, stałym lub płynnym, kwaśnym lub zasadowym, ale im się to nie udało.

Zipfel (32) systematycznie badał wpływ całego szeregu substancyj w związku z ich oddziaływaniem na rozwój bakteroidów jak n.p. wpływ kwasów organicznych jak: nukleinowego, winnego, mlecznego; substancyj białkowych jak: nitrozy; węglowodanów jak: glukozy, sacharozy; wyższych alkoholi jak: mannitu; aminokwasów jak: leucyny, tyrozyny i asparaginy. Wszystkie te jednak substancje dały wynik ujemny, gdyż znajdował tylko zwykłe laseczki. W końcu użył do doświadczenia połączeń purynowych jak kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu moczowego, guaniny i guanidyny. Wśród tych połączeń tylko kofeina dawała rezultaty pozytywne w dawkach 1, 2, 3 i 4 ‰. Najliczniejsze były bakteroidy przy ilości 3 ‰ kofeiny. Dawka 5 ‰ kofeiny wstrzymywała całą wegetację. Następnie Barthel (1) częściowo powtórzył i uzupełnił poprzednie doświadczenie Zipfla próbując działania następujących alkaloidów roślinnych: kofeiny (+), guaniny (—), guanidyny (+), pirydyny (+) i chinoliny (+). Dwa ostatnie połączenia znajdują się w roślinach motylkowych. Doświadczenie jego wykazało, że z pomiędzy pięciu użytych do badań alkaloidów, cztery z nich (zaznaczone znakiem +) wpływają na przekształcenie laseczek w bakteroidy, ale w bardzo różnym stopniu. Wśród nich kofeina zajmuje pierwsze miejsce, a trudno jest wytłumaczyć ten jej uderzający wpływ. Widocznie motylkowe jako rośliny najbogatsze w alkaloidy zawierają je w korzeniach w czasie, kiedy w brodawkach tworzą się bakteroidy. Przemawia zatem również i doświadczenie Hiltnera (12), który, hodując *B. radicola* na podłożu stałym z dodatkiem wyciągu z motylkowych i z ich korzeni, otrzymał bakteroidy bardzo dobrze rozwinięte. Normalny rozwój bakteroidów w brodawkach motylkowych zależy prawdopodobnie od obecności alkaloidów w korzeniach tych roślin. Z doświadczeń Vogla i Webera (29) przeprowadzonych na łubinie wynika, że istnieje ścisła łączność pomiędzy zawartością azotu i zawartością alkaloidów. Korzystny rozwój łubinu stwierdzili na roślinach odżywiających się przy wydatnej pomocy bakteryj brodawkowych; rośliny te posiadały największą zawartość alkaloidów, a równocześnie największą zawartość azotu.

Jak Schmidt (23) podaje są dwa poglądy na znaczenie jakie mają alkaloidy dla roślin. Według jednych alkaloidy są potrzebne przy kiełkowaniu i w czasie rozwoju młodej

roślinki, do pewnego więc stopnia służą jako substancja odżywcza, — według drugich są uważane jako produkt rozpadu lub materia wydzielona, które to ciała są bez znaczenia dla wzrostu roślin. Doświadczenia wykazały, że drugi pogląd jest słusznym. Według późniejszych spostrzeżeń przynajmniej część alkaloidów musi być uważana jako produkt rozpadu przy przemianie materji w roślinie, którą to część roślina magazynuje, aby jej służyła jako ochrona przeciw owadom lub innym zwierzętom. Wskazują na to miejsca magazynowania tych substancyj najbardziej wysunięte, jak zewnętrzna część korzenia, łupiny nasion, kora i liście. Nie są jednak znane biologiczne funkcje alkaloidów, bo mogą też służyć jako materia zapasowa w procesie asymilacji.

Gamałeia (8), który badał wpływ kofeiny na rozmaite bakterje, postawił hipotezę, że chodzi tu o działanie na ciała nukleinowe komórki. Bazarowski (2 i 3) stwierdza na podstawie doświadczeń, że dwa czynniki wpływają na przekształcenie bakterij brodawkowych w bakteroidy; pewna kwasowość środowiska, albo obecność pochodnych purynowych. Ponieważ oba te czynniki występują w brodawkach roślin motylkowych, więc przekształcenie laseczek w bakteroidy, uważane przez autora za stadium przypadkowe, w tym wypadku nabiera cech stałości. Bazarowski w doświadczeniu swym użył teobrominy w ilości 0,05% i 0,01%, (pod wpływem której bakteroidy się nie tworzyły) oraz kofeiny w ilości 0,1%, 0,5% i 0,01%. Wytworzone w ten sposób bakteroidy nie są w stanie według autora wiązać azotu wolnego z powietrza.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.

W doświadczeniu tem chodzi o przedstawienie cyklu rozwojowego *B. radiculicola* na pożywce z dodatkiem kofeiny, oraz o wykazanie zmian morfologicznych jakim ulegają z biegiem czasu wyhodowane na tej pożywce bakteroidy. Inni autorowie przeprowadzali podobne doświadczenia na pożywkach stałych, agarowych z dodatkiem kofeiny; w doświadczeniu zaś opisanem w niniejszej pracy użyto nieco zmodyfikowanej pożywki Ashby'ego, podanej przez Waksmana (31), płynnej, mineralnej, z dodatkiem 0,1% coffeinum purum, oraz z dodatkiem 5% zwykłego buljonu bakterjologicznego i 5%

wyciągu z ziemi, gdyż na pożywce w ten sposób zmodyfikowanej *B. radicum* rozwija się o wiele bujniej.

Skład pożywki: na 1000 cm³ wody, 15 g mannitu, 3 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,2 g NaCl, 0,1 g CaSO₄, 50 cm³ buljonu, 50 cm³ wyciągu z ziemi, 1 g coffeinum purum. Reakcja tej pożywki była lekko zasadowa (PH 7,5). Do badania jak i do nastawiania odpowiedniego odczynu pożywki używano barwnej skali Michaelisa.

Według jednych autorów jak Barthel (1) odczyn podłoża nie ma wprawdzie najmniejszego związku z tworzeniem bakteroidów, lecz inni stwierdzają istotną zależność tworzenia się bakteroidów od koncentracji podłoża. I tak Stutzer (26) zauważył najliczniejsze bakteroidy na pożywce o odczynie słabo kwaśnym; Mazé (17b) obserwował w hodowlach 24 godzinnych formy rozgałęzione przy dodaniu 1% kwasu winowego lub szczawiowego, ale w temperaturze 35°, a nawet 39—40°; również Śnieszko (27) stwierdza wybitny wpływ koncentracji jonów wodorowych na zmiany morfologiczne u *B. radicum*. Ponieważ korzenie roślin motylkowych mają reakcję kwaśną, a łącznie z tem bakterje brodawkowe lepiej się rozwijają w środowisku lekko kwaśnym, nastawiono więc dwie serie z powyższą pożywką o dwu różnych odczynach; a mianowicie o koncentracji PH 6,5 i PH 7,0 dla bakterji izolowanych z grochu i koniczyny, a PH 7,0 dla bakterji izolowanych z łubinu, gdyż łubin rozwija się raczej w środowiskach obojętnych, ponieważ kwasota jego soków roślinnych jest mniejsza.

W ten sposób przygotowaną pożywkę rozlano do kolbek 100 cm po 50 cm³ do każdej (na każdą serję doświadczenia przypadło 15 kolbek) — a po wysterylizowaniu szczepiono kulturą tygodniową bakterji izolowanych z brodawek korzeniowych łubinu niebieskiego, grochu i koniczyny czerwonej. Kultury użyte do doświadczenia były wyosabniane z brodawek roślin przed dwoma laty i przez ten cały czas trzymane były na pożywce mineralnej bez kofeiny.

Bakterje brodawkowe pochodzące z łubinu, grochu i koniczyny, użyte do doświadczeń, stanowią według ogólnie przyjętej obecnie nomenklatury amerykańskiej (Fred, Baldwin, McCoy (7) osobne gatunki nazwane:

Rhizobium trifolii (grupa koniczyny),

Rhizobium leguminosarum (grupa grochu, wyki, soczewicy),

Rhizobium lupini (grupa łubinu, seradeli).

Łubin niebieski, groch i koniczyna czerwona zostały wybrane jako przedstawiciele grup roślin najczęściej u nas spotykanych.

Kolbki zaszczipione wzwyż wymienionemi szczepami *B. radicola* trzymane były przez cały czas doświadczenia, które trwało 12 tygodni, w termostacie o temp. 22 — 25° C. Przed zaszczipieniem kolbek zrobiono preparaty gramowe z kultur przeznaczonych do doświadczenia w celu przekonania się raz o ich czystości, powtórę zaś dla porównania morfologii kultur tygodniowych trzymanych stale na pożywce agarowej, mineralnej, z takimiż kulturami z pożywki kofeinowej. Już na drugi dzień po zaszczipieniu kolbki badano makroskopowo i mikroskopowo, i od tego czasu przez cały ciąg doświadczenia robiono preparaty z początku co drugi dzień, później nieco rzadziej, w celu przekonania się o zmianach morfologicznych, którym ulegają bakterje brodawkowe pod wpływem kofeiny. Z każdej kolbki robiono po trzy preparaty, które barwiono przeważnie fuchsyną rozcieńczoną, niekiedy zaś mieszaniną fuchsyny i błękitu metylenowego Loefflera. W pierwszych dniach doświadczenia z powodu słabego wzrostu bakteryj musiano zawartość kolbek centryfugować.

Dla krótkości bakterje brodawkowe oznaczone są według roślin, z których zostały wyizolowane. Już we wzroście makroskopowym zachodziły między szczepami pewne różnice. A mianowicie łubin rośnie przez pierwsze 10 dni tylko w postaci osadu, a płyn nad osadem jest zupełnie przejrzysty, później pożywka zaczyna mętnieć i w miarę dalszego wzrostu stopień zmętnienia jest coraz silniejszy. Koniczyna i groch rosną od początku w postaci zmętnienia i osadu, w miarę zaś wzrostu zmętnienie jest coraz słabsze, niekiedy ziarniste, osad zaś coraz wyraźniejszy; przy końcu doświadczenia u grochu jest on lekko brunatny, u koniczyny kłaczkowaty i brunatny.

Koncentrację jonów wodorowych na początku i na końcu doświadczenia ilustruje podana tabelka. PH końcowe pożywki podane jest jako średnia z pięciu prób w każdej serji. Jak widzimy z powyższej tabelki koncentracja jonów H przy końcu doświadczenia jest u różnych gatunków roślin różna. Według Sierakowskiego (25) bakterje regulują pH, zakwaszając czy też alkalinizując podłoże do stopnia potrzebnego do rozwoju. Początkowe stężenie jonów H ma znaczenie dla początkowej intensywności rozwoju. W doświadczeniu tem

	PH pożywki	
	początk.	końcowe
Łubin niebieski	7,0	7,4
Groch	7,0	7,0
	6,5	6,4
Koniczyna czerwona	7,0	6,0 — 6,2
	6,5	6,0 — 6,2

bakterje brodawkowe wyosobnione z łubinu alkalizują pożywkę, a wyosobnione z koniczyny zakwaszają; bakterje izolowane z brodawek grochu pozostawiają odczyn pożywki bez zmian. Potwierdzają ten wynik również i doświadczenia Meviusa (10), czy też autorów cytowanych przez niego (Arrhenius, Fred i Davenport, i in.), które wykazały, że brodawki u roślin motylkowych pojawiały się raczej w środowiskach kwaśnych. I tak Arrhenius podaje dla względnego rozwoju brodawek koniczyny i grochu pH 5,0 — 7,0 (optimum pH 6,0), a dla łubinu pH 6,0 — 8,0 (optimum pH 7,0).

Przechodzę teraz do szczegółowego omówienia zmian morfologicznych na podstawie preparatów mikroskopowych.

W doświadczeniu z łubinem już w preparatach z 48^h hodowli można było zauważyć liczne laseczki silnie zabarwione, w przeważającej liczbie posiadające wakuolę. Wakuola ta umieszczona jest albo w środku laseczki, a chromatyna zbita jest wówczas na biegunach, lub też wakuola znajduje się na jednym, a ziarnko chromatyny na drugim biegunie laseczki. Tabl. I. Nr. 1. Te dwa typy zwakuolizowanych laseczek, charakterystycznych dla *B. radiculicola* spotyka się u łubinu w ciągu całego doświadczenia. Dopiero pod koniec pierwszego tygodnia oprócz wyżej opisanych dwu typów laseczek zaczynają się pojawiać drobne laseczki rozgałęzione, najczęściej typu „Y”, przyczem zdarza się że na wszystkich trzech końcach rozgałęzień znajduje się wodniczka. Spotyka się też czasem laseczki nieco dłuższe niż poprzednie zawierające po kilka (3 — 4) wakuoli. Laseczki posiadające po kilka wodniczek oraz rozgałęzione utrzymują się jednak krótko; bardzo możliwe, że ulegają rozpadowi, a na ich miejsce spo-

tyka się ziarna w dużej ilości, oraz laseczki bardzo drobne, zbliżone do kokków. Laseczki te silnie się barwią, wiele zaś wśród nich posiada wakuolę w środku, a ziarna chromatyny na biegunach. Formy te utrzymują się począwszy od 6 tygodnia, aż do końca doświadczenia. (Tabl. III. Nr. 2 i 3).

W preparatach porównawczych barwionych metodą Grama z kultur tygodniowych z agaru bez kofeiny znajdowano laseczki gramujemne, o końcach zwężonych oraz dużo mniejsze laseczki z wakuolą w środku.

U grochu w pierwszym preparacie, na drugi dzień po zaszczepieniu, spotyka się na ogół bardzo mało laseczek, słabo zabarwionych. W preparatach z pożywki o odczynie PH 6,5 spotykano obok pojedynczych, małych, równomiernie zabarwionych laseczek, również laseczki dość duże, ziarniste. Już na trzeci dzień, a więc dużo wcześniej niż u łubinu znajdowano wybitną przewagę form dużych, nieregularnych. (Tabl. III. Nr. 4). Oprócz zwykłych laseczek równomiernie silnie zabarwionych spotyka się laseczki z rozszerzonym jednym końcem o płazmie ziarnistej, nierównomiernie zabarwionej kształtem swym przypominające maczugi, bakteroidy kuliste oraz formy duże wyglądające jak stosunkowo grube laseczki nitkowate.

W obydwu serjach pożywki, a więc przy koncentracji pH 6,5 i pH 7,0 przez pierwsze dwa tygodnie występuje wzrost w formie, której L ö h n i s (16) daje nazwę symplazmy, a w niej drobne ziarenka. W hodowli trzy tygodniowej duże formy nitkowate spotykane uprzednio, ulegają jakby zanikowi, coraz więcej zaś występuje form małych, zwakuolizowanych, oraz luźnych ziarn. W końcu przeważają formy zwakuolizowane różniące się między sobą tylko wymiarami, przy czym chromatyna układa się na końcach laseczki. (Tabl. III. Nr. 5). W dłuższych laseczkach spotyka się po kilka wakuoli. Formy drobne, silnie zwakuolizowane utrzymują się do końca. (Tabl. III. Nr. 6).

W preparatach gramowych z kultury tygodniowej z agaru bez kofeiny spotyka się bardzo drobne laseczki o końcach zaokrąglonych, w środku laseczki znajduje się wodniczka; rzadziej umieszczone są wodniczki na biegunach.

Preparaty z koniczyny z hodowli 48^h wykazują tylko nieliczne słabo jednostajnie zabarwione laseczki. Na trzeci dzień tak jak i u grochu występuje wielka ilość form silnie rozgałęzionych, poskręcanych, gwiazdzistych oraz kulistych;

niektóre niejednolicie zabarwione (Tabl. III. Nr. 7). Przy barwieniu mieszaniną fuchsyny i błękitu metylenowego formy nieregularne, duże barwią się fioletowo, małe zaś laseczki silnie czerwono. W drugim tygodniu zaczynają pokazywać się drobne laseczki z wakuolą w środku lub bez, występujące skupieniami. Robi to wrażenie jakby gromady drobnych laseczek pochodziły z jednej substancji macierzystej. Przy tem ilość form rozgałęzionych i dużych kulistych zmniejsza się na korzyść drobnych laseczek silniej się barwiących. Pod koniec piątego tygodnia zmniejsza się również ilość małych laseczek jakby ulegały autolizie, z wydzielaniem ledwie dostrzegalnych ziarenek, których z biegiem czasu jest coraz więcej (Tabl. III. Nr. 8). Podobny rozkład laseczek na ziarniste twory obserwowali również Löhnis i Hansen (14). Do końca doświadczenia w preparatach z pożywki o odczynie PH 7,0 znajdowano w przeważającej liczbie drobne laseczki, niekiedy jakby złożone z 2 — 3 ziarenek; w mniejszej ilości występowały bakteroidy o kształcie kulistym większe i mniejsze oraz nieliczne formy nitkowate, szerokie z ziarnistą chromatyną. Natomiast przy stężeniu pH 6,5 (w którym wzrost jest wogóle bujniejszy) spotkać można bardzo dużo ziarn, ale obok bakteroidów kulistych występują również choć w niewielkiej ilości bakteroidy rozgałęzione z plazmą ziarnistą. Niektóre z nich posiadają ziarna silnie łamiące światło. W preparatach barwionych nawet fuchsyną rozcieńczoną barwią się silnie, bakteroidy zaś bardzo słabo wyglądając wówczas jak cienie. Metodą Moellera na zarodniki ziarna te się nie barwią. Są to najprawdopodobniej formy gonidjalne (Tabl. III. Nr. 9). Zjawisko to niejednokrotnie było omawiane w literaturze. Bazarewski (2), który otrzymał je na pożywce agarowej z kofeiną sądzi, że są to skupienia ciał białkowatych. Wcześniejsi autorowie uważali je za spory, późniejsi zaś opracowując cykl rozwojowy organizmów brodawkowych rozróżniali laseczki, kokki, gonidangja i gonidja.*)

W preparacie porównawczym z kultury tygodniowej z agaru bez kofeiny barwionym metodą Grama znajdowano

*) Autorowie odnośnych prac nie są wymienieni w piśmiennictwie dołączonym do niniejszej pracy, gdyż zajęłoby to za wiele miejsca. Wszystkie odnośne prace cytowane są według monografji Fred, Baldwin i Mc Coya gdzie zostały należycie rozpatrzone.

laseczki Gram — , drobne, nierównomiernie się barwiące, z silniej barwiącym się ziarnkiem chromatyny na obu biegunkach lub w środku; czasem spotykamy trzy lub cztery ziarnka chromatyny.

STRESZCZENIE.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że jednak nie wszystkie szczepy bakterij brodawkowych zachowują się jednakowo na pożywce z dodatkiem kofeiny. A mianowicie bakterje brodawkowe łubinu są przez cały czas doświadczenia drobne; bakteroidy rozgałęzione również drobne; wykształcają się późno i prędko zanikają, a utrzymują się stale laseczki z wakuolą, charakterystyczne dla *B. radicola*, tylko u różnych szczepów występujące w różnej koncentracji pH. Tak dużych i licznych form rozgałęzionych jak u koniczyny i grochu nie spotyka się całkiem u łubinu. Natomiast szczepy bakterij izolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny i grochu mają naprzód kształt zwykłych laseczek słabo, jednostajnie zabarwionych, niezakuolizowanych, dość nielicznych, ale już na trzeci dzień laseczki te przekształcają się w bakteroidy bardzo liczne, o formach nieregularnych.

U grochu przechodzą właściwie bakteroidy tylko dwa stadja rozwojowe. Naprzód mają kształt dużych laseczek nitkowatych z plazmą nierównomiernie zabarwioną. Później ulegają zanikowi, a na ich miejsce występują coraz liczniejsze i bardziej zwakuolizowane laseczki, często przybierając formę owalną.

Największą różnorodność form spotkać można wśród bakteroidów koniczyny, a mianowicie bakteroidy kuliste większe i mniejsze, oraz bakteroidy rozgałęzione, poskręcane lub gwiaździste. W drugim mniej więcej tygodniu ulegają one częściowemu zanikowi i stają się drobniejsze; jednak do końca doświadczenia bakteroidy się utrzymują, a niektóre z nich zawierają wyżej opisane ziarna (możliwe formy gonidjalne).

Wszystkie trzy szczepy *B. radicola* zachowują się jednakowo pod tym względem, że w drugim tygodniu doświadczenia u wszystkich zaznacza się zmiana morfologiczna bakteroidów. Miejsce typowych bakteroidów zanikających częściowo lub całkowicie zajmują ziarenka pojawiające się w dużej ilości lub bardzo drobne laseczki zbliżone do kokków.

W preparatach gramowych z kultur tygodniowych z agaru bez kofeiny znajdują się u wszystkich trzech szczepów drobne laseczki gramo-ujemne, posiadające jedną lub więcej wakuoli, przeważnie ułożonych biegunowo.

W zakończeniu niniejszej pracy składam serdeczne podziękowanie P. Dr. Stanisławowi Śnieszce za cenne wskazówki, jakoteż za okazywaną mi w ciągu mej pracy koleżeńską życzliwość.

OPIS TABLICY.

- Nr. 1. *B. radicola* wyosobione z łubinu niebieskiego. Preparat z hodowli 48^h, barwiony fuchsyną rozcieńcz. Pow. 1:1,500.
- Nr. 2. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z hodowli 6-cio tygodniowej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 3. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z kultury dwu miesięcznej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 4. *B. radicola* wyosobnione z grochu. Preparat z hodowli czterodniowej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 5. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z kultury 6-cio tygodniowej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 6. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z kultury dwu miesięcznej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 7. *B. radicola* wyosobnione z koniczyiny czerwonej. Preparat z hodowli 6-cio dniowej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 8. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z kultury 6-cio tygodniowej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.
- Nr. 9. *B. radicola* jak wyżej. Preparat z kultury dwu miesięcznej, barwiony fuchsyną. Pow. 1:1,500.

PIŚMIENNICTWO.

- 1) Barthel Chr. 1921. Ann. Inst. Past. **35**: 634 — 647.
- 2) Bazarowski S. 1927. Roczniki Nauk Roln. i Leśn. **17**: 1 — 34.
- 3) — 1929. Roczniki Nauk Roln. i Leśn. **21**: 473 — 484.
- 4) Białosuknia W. i Klott C. 1923. Roczniki Nauk Roln. i Leśn. **9**: 288 — 335.

- 5) Buchanan R. E. 1909. Zentrbl. f. Bakt. II. **23**: 59 — 91. (znane z referatu).
- 6) Dangeard M. P. 1926. Le Botaniste. Série XVI. Janvier, 1 — 228.
- 7) Fred E. B., Baldwin I. L., Mc. Coy E. 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Univers of Wisconsin Stud. in Science, n^o5, Madison, Wis.
- 8) Gamaleia cytowane według pracy Barthla (1).
- 9) Gangulee N. 1926. Ann. Appl. Biol. **13**: 244 — 255.
- 10) Górski M. i Dąbrowska O. 1925. Rocznik Nauk Roln. i Leśn. **14**: 445 — 462.
- 11) Hiltner L. 1900. Arb. K. Gesamt. Biol. Abt., **1**: 177 — 222 (znane z referatu).
- 12) Hiltner L. 1900. Zentrbl. f. Bakt. II. **6**: 273. (cytowane według Barthla) (1).
- 13) Löhnis F. 1926. Vorlesungen über landwirtschaftl. Bakteriologie. Berlin. 1926.
- 14) Löhnis F. and Hansen R. 1921. Jour. Agr. Researsch (U. S.) **20**: 543 — 556.
- 15) Löhnis F. and Smith N. R. 1916. Jour. Agr. Researsch (U. S.) **6**: 675 — 702.
- 16) Mazé M. 1897. Ann. Inst. Past. **11**: 44 — 54.
- 17 a) — 1898. Ann. Inst. Past. **12**: 1 — 25.
- 17 b) — 1898. Ann. Inst. Past. **12**: 128 — 155.
- 18) — 1899. Ann. Inst. Past. **13**: 145 — 155.
- 19) Mevius W. 1927. Reaktion des Bodens u. Pflanzenwachstum. Die indirekte Beeinflussung der Pflanzen durch die Wasserstoffionenkonzentration des Nährsubstrates. Naturwissenschaft u. Landwirtschaft Heft. 11. München. 1927.
- 20) Neumann P. 1902. Landw. Vers. Sta., **56**: 187—202. (znane z referatu).
- 21) Prażmowski A. 1890. Rozprawy Wydz. matem. przyrodn. Akad. Umiej. w Krakowie. **21**: 25 — 134.
- 22) Raabe H. 1922. Przegl. Epidemjol. **2**: 283 — 323.
- 23) Schmidt E. Pharmazeut. Chemie II. Bd. Organ. Chemie II. Abt.
- 24) Sierakowski St. 1921. Przegl. Epidemjol. **1**: 549 — 557.
- 25) — 1923. Med. Dośw. i Społ. **1**: 79 — 97.
- 26) Stutzer A. 1901. Zentrbl. f. Bakt. II. **7**: 897 — 912.
- 27) Śnieszko St. 1928. Rozprawy Wydz. matem. przyr. Pol. Akad. Umiej. **68**, Dz. B. nr 9, 1 — 17.
- 28) Thornton H. G. and Gangulee N. 1926. Roy. Soc. (London) Proc., Ser. B. **99**: 427 — 451.
- 29) Vogel i Weber. 1922. Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung. A. z. II: 85 — 95. (znane z referatu).
- 30) Waksman S. A. Methoden d. mikrobiol. Bodenforsch. Abt. XI, Teil 3, Heft 5, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. pod redakcją Abderhaldena.
- 31) Waksman S. A. 1927. Principles of Soil Mikrobiology. London, Bailliére Tindall and Cox. Rozdziały IV i XXII.
- 32) Zipfel H. 1911. Zentrbl. f. Bakt. II. **32**: 97 — 137. (znane z referatu).

RÉSUMÉ.

Les expériences faites ont démontré que les souches des bactéries nodulaires ne se comportent pas toutes identiquement sur le bouillon de culture additionné de caféine. Notamment les bactéries nodulaires du lupin restent menues pendant toute la durée de l'expérience; les bactéroïdes ramifiés restent également menus, ils se développent tard pour disparaître vite, tandis que seuls se maintiennent les bacilles à vacuole, caractéristiques pour le *B. radicicola*, qui, cependant apparaissent dans une concentration pH différente pour les diverses souches. On ne rencontre jamais pour le lupin des formes aussi grandes et aussi ramifiées que pour le trèfle et le pois. Par contre les souches des bactéries isolées des nodules radicaux du trèfle et du pois commencent par adopter la forme de simples bacilles faiblement mais uniformément colorés, non vacuolisés et assez nombreux; dès le troisième jour ces bacilles se transforment en bactéroïdes très nombreux, de formes irrégulières.

Les bactéroïdes du pois ne passent en vérité que par deux stades de développement. Ils commencent par revêtir la forme de grands bacilles filiformes au plasma inégalement coloré. Plus tard ils viennent à disparaître et sont remplacés par des bacilles de plus en plus nombreux et vacuolisés affectant souvent la forme ovale.

On rencontre la plus grande variété de formes parmi les bactéroïdes du trèfle, entre autres les bactéroïdes globuleux plus ou moins grands ainsi que des bactéroïdes ramifiés, tortillés ou étoilés. Au cours de la deuxième semaine ils disparaissent partiellement et deviennent plus petits; cependant ces bactéroïdes se maintiennent jusqu'à la fin de l'expérience et quelques uns d'entre eux contiennent les grains décrits plus haut (ce sont probablement des formes gonidiales).

Les trois souches de *B. radicicola* se comportent identiquement quant à l'apparition chez chacune d'elles de modifications morphologiques des bactéroïdes au cours de la deuxième semaine d'expériences. La place des bactéroïdes typique disparaissant partiellement ou en totalité est occupée par les granules apparaissant en grande quantité ou par des bacilles très menus rapprochés des coques.

Des cultures d'une semaine sur agar-agar, sans caféine, donnent dans les trois souches de menus bacilles de Gram—, possédant une vacuole ou davantage, disposée pour la plupart polairement.

Institut vétérinaire et de Médecine expérimentale de Cracovie.

Nr. 1.

Nr. 2.

Nr. 3.

Nr. 4.

Nr. 5.

Nr. 6.

Nr. 7.

Nr. 8.

Nr. 9.