LESZEK MICHALSKI

Wpływ roztworów kwasu para-aminobenzoesowego (witaminu H_1) na niektóre czynności życiowe *Paramaecium caudatum*.

Toruń 1951

Leszek Michalski

WPŁYW ROZTWORÓW KWASU PARA-AMINOBENZOESOWEGO /WITAMINU H_1/ NA NIEKTÓRE CZYNNOSCI ŻYCIOWE Paramaecium caudatum.

praca na stopień Magistra fil. w zakresie Biologii.

Toruń 1951.

Wpływ witamin na przejawy życiowe Paramaecium caud. jest zagadnieniem mało opracowanym. K a l m u s /'31/ w swej monograficznej pracy, poświęconej wymoczkowi, wymienia tylko prace C a l k i n s a /'16/ i F l a t h e r a /'18/ podkreślając nowość problemu. Zagadnienie to przedewszystkim skierowuje uwagę na witaminowe czynniki wzrostowe organizmu.

Specyficzne własności kwasu p-aminobenzoesowego - witaminu H^1, podstawowego metabolitu wielu mikroorganizmów, zwróciły uwagę na możliwości zastosowania tegoż specyfiku do doświadczeń z Paramaecium caud. Opierając się bowiem na najnowszych pojęciach, że liczne substancje wpływające na wzrost mikroorganizmów są jednocześnie czynnikami wzrostowymi dla roślin i zwierząt, założyć można à priori że wpływ witamin wzrostowych na wzrost Paramaecium caud. powinien być dodatni. Podkreślić także należy że stosunkowo niedawno uznano biotynę i kwas p-aminobenzoesowy za podstawowe czynniki wzrostowe bakteryjne, a dopiero potem stwierdzono ich znaczenie dla ustrojów zwierzęcych. /B e r /'50/. Według A b d e r h a l d e n a /'44/ kwas p-aminobenzoesowy jest witaminem najbardziej czynnym, bowiem w stosunku do niektórych szczepów bakteryjnych działa w rozcieńczeniach bardzo znacznych bo wahających się w granicach od 10^{-8} do 10^{-11} /B e r /'50/. Ciekwawym jest także fakt, że kwas p-aminobenzoesowy w dużych stężeniach nie pobudza, a hamuje rozwój różnych gatunków bakterii. Cechą tą upodabnia się bardzo do prawie wszystkich znanych nam hormonów zwierzęcych, wykazujących wyraźne dwufazowe działanie tj. że zależnie od dawki działają w pewnym kierunku hamująco lub pobudzająco.

Przystępując do opracowania zagadnienia wpływu witaminu

H_1 na przejawy życiowe Paramaecium caud. należałoby na wstępie zwrócić uwagę na kwas p-aminobenzoesowy jako czynnik chemiczny, należałoby prześledzić wpływ roztworów tegoż na długość życia Paramaecium, na wielkość komórki, szybkość ruchu, na wodniczki tętniące, na podział oraz na zdolności regulacyjne i adaptacyjne wymoczka.

Wielu już autorów analizowało zdolność przystosowawczą pierwotniaków względem różnorodnych czynników chemicznych. Począwszy od doświadczeń nad zjawiskami adaptacyjnymi P r o w a z e k 'a /'10/ u ameb w roztworach NaCl, poprzez badania adaptacji wymoczków do cukrów Y a s u d y /'00/, skończywszy na pamiętnych z krytycznego nastawienia H a r n i s c h a /'26/ doświadczeń J o l l o s a /'21/ nad adaptacją Paramaecium do kwasu arsenowego, soli wapnia i wysokiej temperatury, cały szereg autorów mówi o fakcie adaptacji nie wgłębiając się w szczegółowe badania. /G ó r s k i /'37/.

Badania nad wpływem roztworów niektórych substancji chemicznych na czynności życiowe Paramaecium wskazywały na obecność specyficznej zdolności wymoczka związanej prawdopodobnie z jego zdolnościami adaptacyjnymi. Mowa tu o procesach regulacyjnych. Regulacja ta objawiająca się występowaniem pod wpływem związków chemicznych zmian, świadczy że zaburzenia w komórce mijają z czasem, pomimo stałego działania środowiska a polegają na zdolności uniezależniania się osobnika od "szkodliwych" wpływów otoczenia.

Praca C h e j f e c a /'35/ doskonale podkreśliła regulację stosunków wewnętrznych Paramaecium w glukozie, na przykładzie tętna wodniczków kurczliwych, szybkości ruchu wymoczka itd. Wysokie stężenie glukozy, wywołujące według E i s e n b e r g a /'25/ plazmolizę ciała, powoduje tylko

częściowe przyhamowanie częstości tworzenia się wodniczków kurczliwych. Według G ó r s k i e g o /'37/ w wszystkich wyżejw wymienionych pracach stwierdzono wielokrotnie zdolność adaptacyjną wymoczków, pozostał natomiast nieznany bliżej mechanizm tego zjawiska. Nie zostały wyraźnie oddzielone dwie właściwe drogi adaptacji: adaptacja przez zmiany, zachodzące w samej komórce, które pozwalają jej na życia w nowych warunkach, oraz adaptacja przez zniszczenie lub zobojętnienie czynnika szkodliwego już w środowisku zewnętrznym, dzięki czemu czynnik ten nie oddziałowywałby wcale na żywą treść komórki. Zagadnieniu temu poświęcił swą pracę G ó r s k i /'37/ używając do wyjaśnienia problemu czynnika chemicznego w postaci kwasów organicznych. G ó r s k i stwierdził, że kwasy wywołują cały szereg zaburzeń morfologicznych i fizjologicznych dopiero w stężeniach zabójczych. W stężeniach nie zabójczych, kwasy przez niego stosowane nie wywierały dostrzegalnego wpływu, jedynie kwas octowy niekiedy powodował powstawanie potworności. Działanie więc kwasów różni się pod tym względem od innych czynników np. wysokiej temperatury, glukozy, soli kuchennej lub jadów. Te czynniki działają już na wymoczki w stężeniach nie zabójczych. Pozatem G ó r s k i stwierdził, że nawet długotrwałe hodowanie wymoczków w krytycznych stężeniach kwasów nie zwiększało odporności wobec tych kwasów.

Nad wpływem kwasów organicznych na wymoczki prowadził także swe badania B a r r a t t /'04, '05/, ustalając stężenia zabójcze wielu kwasów w stosunku do Paramaecium. Między innymi wykazał on, że znikanie w środowisku jonów H jest wynikiem pochłaniania kwasu przez wymoczki. Ilość kwasu pochłoniętego jest jednak minimalna bo wynosi 0,08 - 0,3 % ciężaru ciała wymoczka.

W pracy niniejszej, eksperymentowanie różnymi stężeniami kwasu p-aminobenzoesowego pozwoli porównać wyniki obserwacji z wynikami Barratta, Jollosa, Górskiego, zbliży niewątpliwie do wyjaśnienia wpływu witaminu H_1 na przejawy życiowe Paramaecium caudatum.

Metody pracy.

W pracy niniejszej, obiektem doświadczalnym była czysta linja wymoczka Paramaecium caudatum, hodowana w optymalnych warunkach od lat kilku w Zakładzie Biologii Og. UMK, w temperaturze 15-21°C. na 48-o godzinnym wywarze siana o pH od 6,90 - 7,10, zmienianym co tydzień. 24-y godziny przed doświadczeniem odsączałem wymoczki przez bibułę filtracyjną od pożywki sianowej, do małej ilości środowiska i na sączku przemywałem przegotowaną wodą wodociągową, której pH wahało się w granicach 7,53 - 7,69. Wymoczki pozostawały w tym środowisku do chwili doświadczeń. W celu uniknięcia ewentualny zaburzeń struktury wymoczków wywoływanych wirowaniem, zagęszczanie kultur następowało drogą odsączania środowiska przez sączek.

Użycie do doświadczeń przegotowanej wody wodociągowej, zostało podyktowane koniecznością uniknięcia plazmolizowania komórki, zaobserwowanego w wstępnych doświadczeniach przy użyciu wody/destylowanej.

Woda wodociągowa w Toruniu, pochodzenia zaskórnego, odznacza się wyraźną reakcją zasadową o często zmiennym stopniu pH /7,00 - 8,00/. W celu wyeliminowania jaknajwiększej ilości związków mineralnych zawartych w tej wodzie, usunięto z niej przez przegotowanie twardość przemijającą. Analiza wody z twardości stałej wykazałaże wynosi ona - 17,5° niemieckich, co odpowiada 415 mg $CaCO_3$/ litr, oraz zawiera:

Cl'	-	1,4 mg/litr
$Ca^{\cdot\cdot}$	-	102,0 mg/litr
$Mg^{\cdot\cdot}$	-	32,0 mg/litr
$SO_4^{\cdot\cdot}$	-	450,0 mg/litr
SiO_2	-	10,0 mg/litr

Roztwory kwasu p-aminobenzoesowego, przygotowane na tej

wodzie i używane w moich doświadczeniach, nie były więc roztworami bezwzględnie czystymi. Rezygnując ze ścisłego określenia czynnika działającego, zmuszony byłem zwrócić uwagę w wynikach doświadczeń jedynie na zmiany porównawcze.

Do sporządzenia wyjściowych roztworów kwasu p-aminobenzoesowego użyłem przegotowanej wody wodociągowej o pH 7,53. Punktem wyjścia był roztwór nasycony kwasu krystalicznego w ilości 0,34 g na 100 cm H_2O w temperaturze 13°C. Następnie część roztworu, każdorazowo otrzymanego, rozcieńczałem wodą do podwójnej objętości. W ten sposób otrzymałem szereg roztworów wyjściowych o następującym stężeniu i stopniu pH.

Stęż.roztworu	0,34	0,17	0,085	0,0425	0,0212	0,0106	0,0053	0,0026	0,0013	0,0006	
pH roztworu	3,79	5,02	5,40	5,76	6,14	6,52	6,90	7,20	7,38	7,53	i.t.d.

Zestawienie samych doświadczeń było następujące: dodając do 0,25 cm^3 roztworu o odpowiednim stężeniu, taką samą ilość środowiska o pH 7,53 - 7,69, otrzymałem szereg stężeń odpowiadających podwójnemu rozcieńczeniu każdego z poprzednich.

Stęż.roztworu	0,17	0,085	0,0425	0,0212	0,0106	0,0053	0,0026	0,0013	0,0006	
pH roztworu	5,02	5,40	5,76	6,14	6,52	6,90	7,20	7,38	7,53	i.t.d.

Obserwacje prowadziłem w naczynkach szklannych o pojemn. ca.0,7 cm^3. Ilość środowiska z wymoczkami w doświadczeniach nie przekraczała 0,5 cm^3.

Naczyńka w kilku zestawach doświadczalnych po lo sztuk umieszczałem w czasie pracy w komorze wilgotnej w temperaturze wahającej się w granicach 18,2 - 21,8°C.

Długość życia Paramaecium caud. w roztworach kwasu.

Obserwacje prowadzone w celu ustalenia granicy życia Paramaecium w różnych stężeniach kwasu, zmusiły mnię do nastawienia całego szeregu doświadczeń. Składały się one dla każdego stężenia kwasu z kompletu 10 prób w naczyńkach szklannych o zawartości 0,5 cm^3. W danej objętości środowiska, liczba wymoczków dla każdej próby wynosiła ca. 100. Jako miara długości życia każdej próby służył czas, w którym ginęło ca 50 - 75 % wymoczków. Wyniki doświadczeń prowadzonych na roztworach wyjściowych podaje tabela I.

T a b e l a I.

Długość życia 100 wymoczków w 0,5 cm^3 roztworu kwasu o różnych stężeniach i stopniu pH.
Podane czasy odpowiadają przeciętnym z 10 doświadczeń.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	Długość życia
0,17	5,02	giną natychmiast
0,085	5,40	giną po ca. 2 min.
0,0425	5,76	żyją stale
0,0212	6,14	żyją stale

W celu ścisłego określenia granicy stężenia zabójczego, sporządziłem w przegotowanej wodzie wodociągowej o pH 7,69, dwa szeregi roztworów o następującej procętowości i stopniu pH.

Stężenie roztworu	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04
pH roztworu	5,10	5,24	5,38	5,52	5,66	5,80	5,95

Stężenie roztworu	0,050	0,048	0,046	0,044	0,042	0,040
pH roztworu	5,80	5,83	5,86	5,89	5,92	5,95

Wyniki osiągnięte w tych roztworach obrazują tabele II i III.

T a b e l a II.

Granice życia 100 wymoczków w 0,5 cm^3 roztworu kwasu o różnych stężeniach i stopniu pH.

Podane czasy odpowiadają przeciętnym z 10 doświadczeń.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	Długość życia
0,10	5,10	ca. 30''
0,09	5,24	ca. 1 min.30''
0,08	5,38	ca. 2 min.30''
0,07	5,52	ca. 7 min.
0,06	5,66	ca.18 min.
0,05	5,80	ca. 1 godz.
0,04	5,95	żyją stale

T a b e l a III.

Granice życia 100 wymoczków w 0,5 cm^3 roztworu o różnych stężeniach i stopniu pH.

Podane czasy odpowiadają przeciętnym z 10 doświadczeń.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	Długość życia
0,050	5,80	ca. 1 godz.
0,048	5,83	ca. 10 godz.
0,046	5,86	ca. 38 godz.
0,044	5,89	ca. 72 godz.
0,042	5,92	żyją stale
0,040	5,95	żyją stale

Stężenie zabójcze kwasu p-aminobenzoesowego w mych doświadczeniach, mieści się w granicach 0,042 - 0,044 % roztworu o sto-

Przy odpowiedzi w tych testach należy podać liczbę 23 i 22.

Z a d a n i e XX.

Gęstość żywia 100 procentowego w 0,5 dm³ wynosiła przy 4 stopniach 1 kilogram gęstości.

Jakie mamy odpowiednio przeliczyć z 10 doświadczeń.

Gęstość żywia w kg	pH roztworu	Odczyt żywia
0,10	3,10	ok. 30%
0,07	3,20	ok. 1 mln. 40%
0,08	3,30	ok. 4 mln. 30%
0,07	3,40	ok. 7 mln.
0,06	3,50	ok. 20 mln.
0,05	3,60	ok. 1 mln.
0,05	3,70	40% mln

Z a d a n i e XXI.

Gęstość żywia 100 procentowego w 0,5 dm³ wynosiła w wodzie 1 kilogram gęstości.

Jakie mamy odpowiednio przeliczyć z 10 doświadczeń.

Gęstość żywia w kg	pH roztworu	Odczyt żywia
0,100	3,00	ok. 1 mln.
0,095	3,05	ok. 10 mln.
0,090	3,10	ok. 20 mln.
0,085	3,15	ok. 70 mln.
0,080	3,20	40% mln
0,075	3,25	80% mln

Gęstość żywia przed przeliczeniem wynosi 0,080 - 0,100 w 0,5 dm³ roztworu.

pniu pH 5,89 - 5,92.

Porównując osiągnięte wyniki z wynikami G ó r s k i e g o w stosowanych przez niego roztworach kwasu octowego /0,0265 % - pH 5,8/ i winowego /0,05 % - pH 4,6/, stwierdzić można że granice pH w jakich żyją wymoczki są zależne przedewszystkim od natury chemicznej danego kwasu. W zabójczym działaniu kwasów istnieje ostra granica, wskazują na to wyniki zestawione w tabeli III.

Według G ó r s k i e g o, podawano niejednokrotnie w literaturze, że granice pH, w których mogą żyć wymoczki, nie charakteryzują ich odporności, gdyż o przeżywaniu decyduje nie tylko reakcja czynna środowiska, lecz i jego natura chemiczna. Tak też kwas octowy z doświadczeń G ó r s k i e g o, z łatwością przenika przez błony komórkowe i dlatego jest bardziej toksyczny od winowego. Kwas p-aminobenzoesowy jest kwasem słabym, upodabnia się więc stopniem toksyczności do winowego.

Opierając się na twierdzeniach licznych autorów, że skupienia organizmów posiadają znaczną odporność wobec czynników szkodliwych, B o r e n s t e i n /'38/ zaobserwował skuteczną obronę Paramaecium w warunkach niepomyślnych dla życia. Stwierdził on przy tym, że środowisko decyduje o losach skupionych w nim wymoczków, że dłuższe lub krótsze przeżywanie organizmów, przebywających w gęstej lub rzadkiej koncentracji nie tyle zależy od liczebności, ile od środowiska wymoczków. Szkodliwe bodźce wywołują niejednolitą reakcję wymoczków, więc im większa jest liczba wymoczków e danej objętości środowiska, tem dłuższy czas przeżywania. Obserwacje B o r e n s t e i n a potwierdzja badania B r e s s l a u 'a /'21/ i D r z e w i n y i B o h n 'a /'21/. Według tych autorów, wymoczki w dużych skupieniach

wydzielają substancje autoprotektywne, chroniące je przed intensywnym działaniem trucizny. B r e s s l a u stwierdził u wymoczka Colpidium w środowisku trującym, wydzieloną błonkę która chroniła go od działania trucizn. W tych samych warunkach Paramaecium wyrzuca podobnie działające trichocysty /Fotografia 1/. Dzięki tym błonom i trichocystom absorbującym trucizny, wymoczki w masie mogą przeżywać toksycznie działające środowisko.

Obok koncepcji B r e s s l a u 'a i D r z e w i n y - B o h n a 'a, dotyczącej przeżywania zagęszczonych kultur wymoczków w środowisku trującym, istnieje jeszcze teorja B a r r a t t a, według której w środowisku następuje stopniowe zobojętnianie kwasu drogą pochłaniania go przez wymoczki w ilości 0,08 - 0,3 % ogólnego ciężaru ciała. Pozatem B o d i n e /'36/, S z u l z i n g e r ó w n a i K a ł u s k a /'36/ zaobserwowały stopniowe zalkalizowanie środowiska z kulturą wymoczków. Nie jest także wykluczone zobojętnienie zakwaszonego środowiska, w stopniu bodaj najwyższym przez martwą protoplazmę zabitych wymoczków, o wybitnie zasadowej reakcji i łatwo przepuszczalnej martwej pelliculi.

T a b e l a IV.

Wpływ liczby osobników na długość życia w 0,05 % stężeniu kwasu o pH 5,80.
Obliczeń dokonano po 1 godz. pobytu wymoczków w roztworze.

Liczba osobników w 0,5 cm^3	Ilość żywych	% żywych
10	-----	-----
100	-----	-----
200	38	19 %
500	ca. 306	61 %
1000	ca. 762	76 %

W celu określenia wpływu liczby osobników na długość życia Paramaecium w 0,05 % roztworze kwasu o pH 5,80 , zestawiłem szereg prób o zgęszczeniu 10, 100, 200, 500 i 1000 osobników w 0,5 cm^3 środowiska. Po godzinie działania roztworu, liczyłem w środowisku doświadczalnym ilość żyjących osobników. Wyniki obliczeń w % są zestawione w wyżej podanej tabeli IV.

Zmiany objętości Paramaecium caud. w roztworach kwasu.

G ó r s k i w doświadczeniach swoich zaobserwował, że wymoczki ulegają silnemu spęcznieniu w stężeniach zabójczych stosowanego przez niego kwasu octowego. Pęcznienie to natomiast nie zachodziło w roztworach, w których wymoczki przeżywały stale. Zauważył on także że pęcznienie było tem szybsze im mocniejszy był kwas, jednak wielkość pęcznienia uzależniona była od szybkości działania roztworu, bowiem w stężeniach szybko zabijających pęcznienie odbywało się nieznacznie a ginące wymoczki nie zmieniały wydatniej objętości. Przy podobnym stosowaniu, słabszego w porównaniu z octowym kwasu winowego, zmiana objętości wymoczków następowała również, lecz w mniejszym stopniu i dopiero po dłuższym pobycie wymoczków w roztworach doświadczalnych. W wyniku badań G ó r s k i wykazał, że w zabójczym stężeniu kwasu octowego o pH 5,5 po 2 - u godzinnym działaniu nastąpiło trzykrotne zwiększenie objętości wymoczka i jego jądra, jednakowoż bez zmiany wzajemnego stosunku wielkościowego, co w rezultacie świadczy o jednakowym stopniu przepuszczalności błon komórkowych i jądra. Pozatem wykazał on, że stopień pH roztworu nie ma wpływu na zakres spęcznienia wymoczków.

Zestawiając doświadczenia, w celu zaobserwowania zmian objętości komórki i jądra w roztworach kwasu p-aminobenzoesowego, umieściłem w dwóch środowiskach o objętości 1 cm^3 a stężeniu 0,040 i 0,050 % i stopniu pH 5,95 i 5,80, po 200 wymoczków. Po pobraniu z tego środowiska każdorazowo po 10 osobników, umieszczałem je na szkiełkach podstawowach w obecności drobno strzępionych włókienek waty, użytych w celu ograniczenia ruchu wymoczków. Pomiary poszczególnych preparatów odbywały się w oznaczonym czasie przez mikroskop z nasadką mikrofotograficzną dla formatów 8 x 12, której matówka

służyła jako ekran pomiarowy. W celu otrzymania do pomiarów jednostki linjowej, porównałem uprzednio, podobną metodą używaną miarę z kamerą mikrometryczną. W wyniku sprawdziłem że przy aktualnym powiększeniu mikroskopu i nasadki mikrofotograficznej, używana jednostka pomiarowa równa się 6,6 µ. W przerwach między pomiarami umieszczałem preparaty w komorze wilgotnej.

Obliczenia objętości wymoczków, według wzoru podanego przez F o r t n e r a /'25/

$$V = \frac{2 \cdot 3,14}{3} \cdot m \cdot b^2$$

po przyjęciu że m = oznacza długość wymoczka, b - zaś połowę największej jego szerokości, dały szereg liczb zestawionych w tabeli V.

T a b e l a V.

Zmiany objętości komórki i jądra w roztworach kwasu o różnym stężeniu i stopniu pH.

Dane liczbowe wyrażają średnie wartości z 10 pomiarów. Jednostka pomiarowa linjowa = 6,6 µ

Czas pobytu	Objętość komórki				Objętość jądra			
Stężenie roztworu w %.	0,040		0,050		0,040		0,050	
pH roztworu	5,95		5,80		5,95		5,80	
	w µ	w %	w µ	w %	w µ	w %	w µ	w %
0 min.	396,2	0	472,1	0	26,4	0	31,4	0
15 min.	394,0	-0,5	560,7	18,7	26,8	1,5	37,3	19,3
30 min.	396,5	0,1	649,3	37,5	26,5	0,4	43,2	38,6
60 min.	398,4	0,5	910,1	92,8	27,1	2,7	66,7	113,9
120 min.	399,6	0,9	----	----	27,8	5,4	----	----

ciśnienia jest mniej więcej. W celu przyspieszenia do pewnego jednakowego i takiego, jednakowe wszystkie, jednak nadal wzrosły, aby z nadal alkoholowego. W celu przyspieszenia do pewnego alkoholowego jednakowego i nadal alkoholowego, chemia jednakowa jednakowa zdała H_2O z. W przemian nadal nadal nadal nadal przyspieszenia przyspieszenia nadal nadal.

Całkowita objętość wynosiła, nadal wzrosła jednakowa przez

$$V = r \cdot n = 2 \cdot a \sqrt{2}/2$$

$$V = \frac{2 \cdot 1,16}{2} \cdot a \cdot b^2$$

po przyjęciu że a - długość krawędzi sześcianu, b - dla całego nadal alkoholowego, nadal nadal nadal nadal przyspieszenia w nadal V.

$$V = b \cdot c \cdot 2 \cdot a \cdot K.$$

Nadal przyspieszenia nadal i jedna z przyspieszenia jedna a nadal przyspieszenia i nadal nadal.

Dane liczbowe wynosiły nadal przyspieszenia a 10 nadal.

Przyjęto jednakowe nadal = 0,5 g.

Dane nadal	Objętość nadal		Objętość jedna	
Objętość a =	0,040	0,030	0,040	0,030
2M przyspieszenia	3,97	3,00	3,97	3,00
	V ½	V ½	V ½	V ½
0 nad.	100,2	100,1	100,4	100,0
10 nad.	100,0	100,2	100,0	100,1
30 nad.	100,5	101,2	100,5	101,0
50 nad.	100,9	102,1	100,7	102,1
120 nad.	100,0	104,1	100,0	104,1

Porównanie wyżej wymienionych danych, wskazuje na brak zmiany objętości wymoczka pod wpływem 0,040 % roztworu kwasu, przy stale zachowanym stosunku objętości plazmy do jądra. Małe wahania liczbowe przyjąć należy jako błąd doświadczalny. w roztworze 0,050 % , silnie zabójczym bo działającym w granicach jednej godziny, pęcznienie jest wydatne. W okresie przedśmiertnym, wymoczki zwiększyły swą objętość jednokrotnie, przy zachowaniu stosunku objętościowego plazmy do jądra. Jednakowoż nietylko przez zmianę objętości, upodabnia się działanie roztworów zabójczych kwasu p-aminobenzoesowego do identycznego działania kwasu octowego, pewne podobieństwo można także zauważyć w pęcznieniu tylnego końca wymoczka, ściemnieniu plazmy i wystąpieniu jej ziarnistości. Zaokrąglenie się i uwidocznienie jądra przez smugę go otaczającego wskazuje na pewien stopień utrwalenia wymoczka. /Fotografia 2 i 3/.

Szybkość ruchu Paramaecium caud. w roztworach kwasu.

Wymoczki różnych serii doświadczalnych o różnym stężeniu środowiska i stopniu pH, wprowadzono do szklannych kapilar o średnicy 0,5 mm i długości ca. 10 cm, oraz pomieszczono je pod lupą obok zamontowanej miary linjowej z podziałką co 0,5 mm. Szybkość ruchu poszczególnych osobników, oznaczono przy pomocy stoppera. Srednia pomiarów /20 -u/ szybkości przebycia 5 mm, była dzielona przez 5 w celu otrzymania wartości średniej na milimetr drogi.
Przytaczone więc w tabeli VI wartości liczbowe, stanowią średnią wielkość czasu z uwzględnieniem poszczególnych osobników i przebytych dróg. Pomiary były dokonywane po 15 -o minutowym pobycie wymoczków w różnych stężeniach kwasu.

Wymoczki umieszczone w kapilarze, nie poruszają się przez cały czas obserwacji z jednakową przeciętną szybkością. Według B o r e n s t e i n a szybkość naprzemian wzrasta i i maleje. Przytoczone w tabeli wielkości, charakteryzują szybkość ruchu po 15 -u minutach pobytu wymoczków w rurce. Bezpośrednio po umieszczeniu wymoczków w kapilarze, przebiegają one ruchem niezwykle przyspieszonym przez całą jej długość. Wreszcie cały ruch nieomal ustaje, a wymoczki ujawniają skołnność do gromadzenia się na jednym z końców rurki. Po kilku minutach skupienia rozpraszają się, a pojedyńcze wymoczki przesuwają się ruchem jednostajnym przez całą długość rurki. Po pewnym czasie ruch ponownie zaczyna się skupiać u wylotów rurki. Powstają tu nowe skupienia wymoczków, które po dalszych kilkunastu minutach ponownie się rozpraszają i pływają wzdłuż kapilary. Powtarza się to kilkakrotnie przy każdorazowo wydłużającym się okresie ruchu przemierzającego. Periodyczne tworzenie skupień u wylotów

rurki tłomaczyć można tigmotropizmem.

Zagadnienie wpływu rodzaju środowiska na szybkość ruchu Paramaecium caud., badał B o r e n s t e i n /'38/ porównując ruch wymoczków w środowisku naturalnym /pożywki sianowej/ i sztucznym /wody wodociągowej/. C h e j f e c /'35/ zajmował się szybkością wymoczków w roztworach glukozy. G ó r s k i natomiast badał wpływ kwasowości na szybkość ruchu. Stężenia zabójcze stosowanych przez niego kwasów, zwalniały wybitnie ruch wymoczków. W stężeniach 0,045 - 0,05 % kwasu winowego, w których wymoczki żyły od kilkunastu godzin wzwyż aż do stałego przeżywania, przyhamowanie ruchu było dość znaczne i było przemijające. Pozatem wymoczki nie traciły zdolności do szybkiego poruszania się. Jest to tak zwane zwolnienie ruchu aktywne.

T a b e l a VI.

Szybkość ruchu Paramaecium po 15 -o minutowym pobycie w roztworach kwasu o różnych stężeniach i stopniu pH. Podane szybkości odpowiadają przeciętnym z 20 pomiarów.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	Szybkość w mm/sek.
w kulturze	6,75	0,612
w wodzie wod.got.	7,69	0,804
0,06	5,66	0,303
0,05	5,80	0,402
0,04	5,95	0,520

W 0,04 % roztworze kwasu p-aminobenzoesowego, w którym wymoczki przeżywają stale, zauważamy zwolnienie ruchu które podobnie jak w kwasie winowym jest przemijające i ma charakter aktywny. Natomiast roztwory kwasu powyżej 0,05 % zawalniają ruch wymoczków, w miarę przebiegu czasu aż do zupełnego zaniku przejawów życiowych.

Zachowanie się wodniczków tętniących w roztworach kwasów.

Przejdzmy obecnie do rozpatrzenia zachowania się wodniczków tętniących w roztworach kwasu o różnym stężeniu. Sposób postępowania w doświadczeniach był następujący: z hodowli masowej w pożywce sianowej, wyodrębniłem każdorazowo 10 wymoczków i umieściłem je w szkiełkach doświadczalnych w objętości 0,5 cm^3 pożywki sianowej. W dalszych szeregach doświadczeń, po upływie 24 godzin po przemyciu uprzednim wymoczków przegotowaną wodą wodociągową o stopniu pH 7,69, umieszczałem każdorazowo po 10 wymoczków w szkiełkach: - 1° w przegotowanej wodzie wodociągowej, - 2° w aktualnie używanych roztworach kwasu p-aminobenzoesowego. Po 30 -o minutowym pobycie wymoczków w 0,5 cm^3 środowiska doświadczalnego, przenosiłem małą kroplę z wymoczkami na szkiełko przedmiotowe. Obserwacje mikroskopowe prowadziłem na preparatach z włókienkami drobno strzępionej waty, po tigmotropicznym umiejscowieniu się Paramaecium. Zgodnie z obserwacjami F r i s c h a /'37/, który zauważył przyhamowanie tętna wymoczków w ruchu, mierzyłem tętno wodniczków osobników skupionych w kątach włókienek waty stosowanej do ich umiejscowienia.
Jako czas tętna, oznaczałem stopperem czasy między dwoma kolejnymi skurczami przedniego i osobno tylnego wodniczka. Wyniki osiągnięte w roztworach kwasu, porównywałem z wynikami z kultury i wody wodociągowej. Zdobyłem w ten sposób obraz różnic w tętnie wodniczków pod wpływem różnych środowisk. Średnią wartość poszczególnych wyników przedstawia tabela VII.

Na podstawie danych zestawionych w tabeli jak i doświadczeń G ó r s k i e g o, można wysnuć wniosek że kwasy wpływają hamująco na częstość skurczów wodniczków.

T a b e l a VII.

Średni czas /w sekundach/ tworzenia się wodniczków tętniących w roztworach kwasu o różnych stężeniach i stopniu pH.
Liczby odpowiadają średnim i 10 pomiarów.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	po 30 minutach		po 3 godzinach	
		przedni	tylny	przedni	tylny
w kulturze	6,75	11,6	12,5	11,6	12,5
w wodzie wod. got.	7,69	11,9	13,2	12,2	13,4
0,040	5,95	12,1	13,5	13,0	14,1
0,042	5,92	12,1	13,7	13,3	14,3
0,044	5,89	13,0	14,1	15,5	16,3
0,046	5,86	14,2	15,0	19,4	24,1
0,048	5,83	16,8	15,6	40,3	45,2
0,050	5,80	31,0	31,0	----	----

Odnośnie wpływów stopnia pH na tętno przyjmujemy, że nie zmienia on częstości tętna, bowiem S z u l z i n g e r ó w n a i K a ł u s k a, przy badaniu różnych stężeń podłóż naturalnych wpływających na zmiany tętna, wykazały że odchylenia te nie wynikały ze zmian pH środowiska lecz z jakości i stężenia podłoża stosowanego. Przyjmując jako normę, tętno wodniczków w środowisku kultury o zróżnicowanej szybkości przedniego i tylnego, stwierdzić można, że w miarę zwiększania stężenia kwasu następuje stopniowe przyhamowanie tętna. Coraz bardziej zaciera się różnica w szybkości tętna obydwu wodniczków, W roztworze 0,048 % otrzymujemy odwrócenie wartości - wodniczek tylny tętni szybciej od przedniego. W stężeniu zabójczym 0,050 %, w 30 -ej minucie działania roztworu, obserwujemy podobne zwolnienie tętna jednakowoż bez widocznego w tej chwili zrównania lub odwrócenia

częstości. Zaobserwowane objawy przyhamowania i odwrócenia szybkości tętna wodniczków w roztworach stosowanych a przedewszystkim zabójczych, są związane według B o r e n s t e i n-a z zamieraniem wymoczków. Gdy wodniczek tylny pulsuje dość regularnie, wodniczek przedni opóźnia się coraz bardziej. Następnie w krótkim czasie okres tętnienia obydwu jest ten sam. W dalszym ciągu gdy tylny tętni nadal regularnie, wodniczek przedni zwalnia coraz bardziej swoją pulsację. Po pewnymczasie pulsacja przedniego ustaje zupełnie. Jest to znak śmierci. Tylny natomiast wodniczek tętni jeszcze jakiś czas, aż i on ustaje, a treść wodniczków w formie pęcherzyków wylewa się przez pellikulę nazewnątrz.

Podzielność Paramaecium caud. w roztworach kwasu.

W celu sprawdzenia przebiegu mnożenia się wymoczków w roztworach kwasu p-aminobenzoesowego, sporządziłem komplet prób złożony z naczyniek szklannych z zawartością 0,2 cm^3 aktualnego roztworu kwasu, z pojedyńczym osobnikiem i sprawdzałem po upływie odpowiedniego czasu, liczbę wymoczków potomnych. Próby umieszczone były na okres doświadczalny w komorze wilgotnej w temperaturze 18^0 C.
Dla porównania wyników, przeprowadziłem doświadczenia kontrolne w środowisku pożywki sianowej o pH 6,75 i przegotowanej wody wodociągowej o pH 7,69.
Wyniki liczbowe są zestawione w tabeli VIII.

T a b e l a VIII.

Ilość podziałów wymoczków w roztworach kwasu o różnych stężeniach i stopniu pH.
Podane wartości odpowiadają ilości podziałów w stosunku do liczby wymoczków w każdym okresie godzinowym.

Stężenie roztworu w %.	pH roztworu	Czas w godzinach.						
		0	12	24	36	48	60	72
w kulturze	6,75	—	3	13	5	18	23	38
w wodzie wod.got.	7,69	---	3	7	4	3	2	2
0,040	5,95	---	1	2	1	2	2	1
0,042	5,92	---	1	—	—	1	—	—
0,044	5,89	---	—	—	osobniki ginęły			

Zagadnienie wpływu środowiska na podział wymoczków, było już niejednokrotnie omawiane w literaturze naukowej. Literatura wspomniana podaje między innymi znaczenie tak zwanego czynnika allelokatalitycznego. Jak stwierdził R o b e r t -

s o n /'21 '22 '24/, omawiając doświadczenia nad wymoczkami Enchelys i Colpoda, wymoczki mnożą się w małych objętościach środowiska prędzej niż w dużych, a dwa osobniki umieszczone razem dzielą się częściej, niż pojedyńcze w tej samej objętości środowiska. Zjawisko to tłomaczy R o b e r t s o n, wydzielaniem przez wymoczki specyficznej substancji, przyspieszającej podział. Jednakże koncepcja ta nie znalazła chwilowo potwierdzenia, lecz była krytykowana, bowiem szereg autorów, między innymi G r e e n l e a f /'24 '26/, M y e r s /'27/ i G r i m w a l d /'28/ doszło do wniosków wręcz odwrotnych. Potwierdzenie wyników R o b e r t s o n a osiągnął Y o c o m /'28/ i P e t e r s o n /'29/. P e t e r s o n sądzi że częste dzielenie się Paramaecium caud. w małych ilościach środowiska, jest wynikiem pobudzania się wzajemnego wymoczków, za pośrednictwem specejalnej substancji wydzielanej przez wymoczkido środowiska stale, a nie tylko w chwili podziału, jak to mniemał R o b e r t s o n.

Koncepcja wpływu czynnika allelokatalitycznego w odniesieniu do podziału wymoczków w roztworach kwasu p-aminobenzoesowego, jak wynika z doświadczeń, nie może być brana pod uwagę. O ile zestawione wyniki podziałów w pożywce sianowej /kulturze/, wskazują według S z u l z i n g e r ó w n y i K a ł u s k i e j na decydujący wpływ podłoża naturalnego a tym samym czynnika allelokatalitycznego, na szybkość i ilość tychże, co jeszcze wybitniej podkreśla się w zestawieniu z wynikami podziałów w przegotowanej wodzie wodociągowej, to dane liczbowe charakteryzujące ilość podziałów w roztworach kwasu, wskazują na hamujący wpływ aktualnie stosowanych roztworów.

W 0,040 % roztworze kwasu o stopniu pH 5,95 otrzymywałem

przeciętnie podział 1-2 osobników z 10 na dobę, co stanowi średnio z ogólnej liczby doświadczalnych wymoczków 13 %, wobec 23 % z przegotowanej wody wodociągowej i 53 % z pożywki sianowej /kultury/. W roztworze 0,042 % o stopniu pH 5,92 w ciągu 3 -ch dobowych okresów podzieliły się tylko 2 wymoczki. W 0,044 % roztworze w którym wymoczki w skupieniu 100 osobników, przeżywały do 72 godzin, podział nie następował a pojedyńcze wymoczki ginęły po upływie 24 -ch godzin.

Uwagi ogólne.

Praca niniejsza, obejmująca w ogólnym zarysie przebieg zmian niektórych czynności życiowych Paramaecium caudatum pod wpływem roztworów kwasu para-aminobenzoesowego. Analizując zebrany materiał faktyczny, stwierdzić można w rezultacie, że kwas p-aminobenzoesowy wywołuje dostrzegalne zaburzenia morfologiczne i fizjologiczne dopiero w stężeniach zabójczych.

W wyniku dalszych rozważań, nasuwa się pytanie, czy kwas p-aminobenzoesowy zawarty w środowisku naturalnym, oddziaływywa na metabolizm ogólny organizmu i na tej drodze wpływa na intensywność poszczególnych funkcji, czy też oddziaływywanie jego jest bardziej specyficzne i dotyczy tylko pewnych czynności komórki.

Przyjmujemy z dokonanych obserwacji, że wzrost stężenia roztworu kwasu powoduje stałe zwalnianie tętna wodniczka, oraz że zasadniczo już w nikłym stężeniu, występuje obniżenie podzielności komórki. Czy jednak powyższe fakty upoważniają do wnioskowania o ujemnym wpływie kwasu p-aminobenzoesowego - witaminu H_1, na procesy metabolizmu komórkowego wogóle, a na intensywność procesów wzrostowych w szczególności . Z pewnością nie. Pomimo,że z szeregu prac wiemy że podzielność, stojąca w ścisłym związku z szybkością wzrostu komórki, pozostaje w bezpośredniej zależności od intensywności ogólnej przemiany, oraz że mniej wyraźny związek zaznacza się pomiędzy natężeniem procesów metabolizmu a czynnością wodniczka tętniącego, aczkolwiek podana zależność nasuwa się jeżeli będziemy uważali wodniczek tętniący za organ nietylko osmoregulacyjny ale i wydalniczy, to jednak jest to kwestja, która wymaga poważniejszych badań.

Streszczenie wyników.

1° - Stężenie zabójcze roztworów kwasu para-aminobenzoesowego dla Paramaecium caudatum mieści się w granicach 0,042 - 0,044 % roztworu o stopniu pH 5,92 - 5,89.

2° - Granice pH w jakich przeżywają wymoczki, nie charakteryzują ich odporności, gdyż o przeżywaniu decyduje reakcja czynna środowiska i natura chemiczna kwasu p-aminobenzoesowego.

3° - W roztworach zabójczych kwasu p-aminobenzoesowego wymoczki skupione żyją dłużej niż pojedyńcze.

4° - W gęstych skupieniach toksyczność środowiska zostaje obniżona, dzięki prawdopodobnemu zobojętnieniu zakwaszonego środowiska martwą protoplazmą zabitych wymoczków.

5° - W zabójczych stężeniach kwasu p-aminobenzoesowego plazma i jądro komórki ulegają spęcznieniu, jednak w stale zachowanym stosunku objętościowym. W wypadku maximum, wymoczki zwiększają swą objętość jednokrotnie.

6° - W 0,040 % roztworze kwasu p-aminobenzoesowego następuje przemijające i aktywne zwolnienie ruchu Paramaecium. Stężenia zabójcze zwalniają ruch wymoczków aż do zupełnego zaniku przejawów życiowych.

7° - Zabójcze roztwory kwasu p-aminobenzoesowego zwalniają tętno wodniczków tętniących, z zrównaniem lub odwróceniem częstości pulsacji przedniego i tylnego, w pierwszym okresie pobytu wymoczków w roztworze doświadczalnym.

8° - Roztwory przeżyciowe /0,040 - 0,042 %/ kwasu p-aminobenzoesowego, wywierają hamujący wpływ na podział.

P i ś m i e n n i c t w o.

1. A b d e r h a l d e n R. 1944. Vitamine, Hormone, Fermente. Urban u. Schwarzenberg Verl. Wien 1944.

2. B a r r a t t J. W a k e l i n O. 1904. Die Wirkung von Säuren und Basen auf lebende Paramäcien. Zeitschr. für Allg. Physiologie. 4/438/.

3. B a r r a t t J. W a k e l i n O. 1905. Die Addition von Säuren und Alkalien durch lebendes Protoplasma. Zeitschr. für Allg. Physiologie. 4/10/.

4. B e r A. 1950. Hormony wzrostu roślin zielnych, grzybów i bakterii. Książka i Wiedza. W-wa 1950.

5. B o d i n e J.H. 1921. Hydrogen-ion Concentracion of Protozoan Cultures. Biol. of the Marine biol. association. Vol. XLI. /73/.

6. B o r e n s t e i n P. 1938. Wpływ skupienia na zachowanie się Paramecium caudatum. Prace T-wa Przyjaciół Nauk w Wilnie. Nr.7, 1938.

7. B r e s s l a u E. 1921. Die Ausscheidung von Schutzstoffen bei einzelligen Lebewesen. Bericht. Senkenberg.Naturf.Ges. 54./49/.

8. C a l k i n s G.N. u. E d d y 1916. The action of pancreatic vitamin upon the metabolic activity of Paramecium. Proc.Soc.exp.Biol. a. Med. Vol.14, 1916/17.

9. C h e j f e c M. 1935. Zachowanie się Paramecium caud. w roztworach glukozy. Acta Biol.Exp. Vol.IX /1935/

10. D r z e w i n a A. et B o h n G. 1921. Variations de la susceptibilité aux agents nocifs avec le nombre des animaux traités. C.R.hébdomadaires des séances de l'Acad. des Sciences. 172 /485/.

11. E i s e n b e r g E. 1925. Działanie wodniczka tętniącego u wymoczków /Paramecium caudatum/. Prace Inst.im.Nenckiego Nr.4/1/.

12. F l a t h e r M.D. 1918. The effects ofa diet of polished and of unpolished rice upon the metabolic activity of Paramecium /Vitaminversuche/. Biol.Bull. Vol.35, 1918; ibid., Vol.36, 1919.

13. F o r t n e r H. 1925. Uber die Gesetzmässigkeit der Wirkungen des osmotischen Druckes physiologisch indifferenter Lösungen auf einzellige tierische Organismen. Biol.Centralbl., Bd.45, 1925, s.417.

14. F r i s c h J.A. 1937. The rate of pulsation and the function of the contractile vacuole in Paramecium multimicronucleatum. Arch. für Protistenkunde. Vol.90, 1937, p.123.

15. G ó r s k i W. 1938. O zjawiskach adaptacyjnych Paramecium caudatum w roztworych kwasów organicznych. Prace T-wa Przyjaciół Nauk w Wilnie. Nr. 6, 1938.

16. G r e e n l e a f W. 1924. The Influence of Volume of Culture Medium and Cell Proximity on the Rate of Reproduction of Protozoa. Proc.Soc. Exp.Boil.a. Med. Vol.21, p.405.

17. G r e e n l e a f W. 1926. The Influence of Volume of Culture Medium and Cell Proximity on the Rate of Reproduction in Infusoria. Jour.Exper.Zool. Vol.46, p.143.

18. G r i n w a l d E. 1928. Badanie czynników rozwoju hodowli pierwotniaków. Czy istnieje zjawisko allelokatalizy w hodowlach Colpidium colpoda. Acta Biol.Exper. Vol.3, p.81.

19. H a r n i s c h O. 1926. Kritische Studien über die Gewöhnung freilebender Protozoen an Gifte. Zool.Anz.Suppl.-Bd. 2/99/.

20. J o l l o s V. 1921. Experimentelle Protistenstudien. I.Untersuchungen über Variabilit#t und Vererbung bei Infusorien. Arch.für Prot.kde. 43/1/.

21. K a l m u s H. 1931. Paramecium. Fischer Verl.Jena 1931.

22. M y e r s E.C. 1927. Relation of Density of Population and Certain Other Factors to Survival and Reproduction in Different Biotypes of Pramecium caudatum. Jour.Exper.Zool. Vol.49, p.1.

23. P e t e r s o n W. 1929. The Relation of Density of Population to the Rate of Reproduction in Paramecium caudatum. Physiol.Zool. Vol.2, p.221.

24. P r o w a z e k S. 1910. Einführung in die Physiologie der Einzelligen /Protozoen/. Taubner Verl. Leipzig.

25. R o b e r t s o h T.B. 1921. Experimental Studies on Cellular Multiplication. Biochem.Jour. Vol.15, p.595.

26. R o b e r t s o n T.B. 1922. Reproduction in Cell-Communities. Jour.of Physiol. Vol.56, p.404.

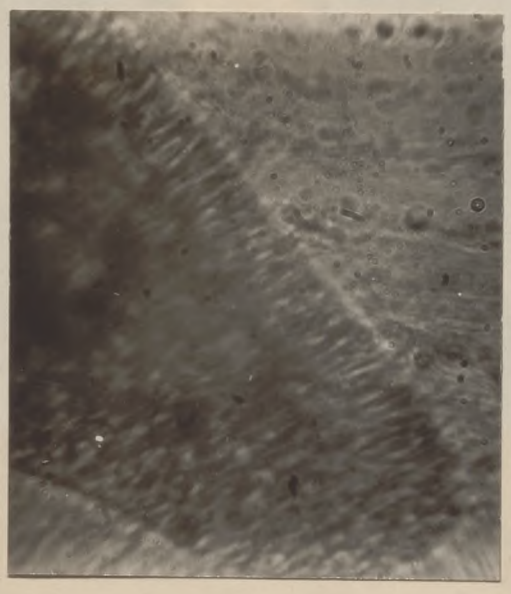
27. R o b e r t s o n T.B. 1924. Allelocatalitic Effect in Cultures of Colpidium in Hay-Infusion and in Synthetic Media. Biochem.Jour. Vol.18, p.124I.

28. S z u l z i n g e r ó w n a M. i K a ł u s k a H. 1936. Hodowle Paramecium caudatum i Colpidium colpoda na różnych podłożach naturalnych. Acta Biol.Exper. Vol.X, 1936. p.133.

29. Y o c o m H.B. 1928. The Effect of the Quantity of Culture Medium on the Divion Rate of Oxytricha. Biol.Bull.of the Marine biol.association. Vol.54, p.410.

30. Y a s u d a A. 1900. Studien über die Anpassungsfähigkeit einiger Infusorien an concentrirte Lösungen. Jour.Coll.Univ.Tokyo. Vol.XIII/101/.

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Ogólnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.



Fot. 1.

Fot. 1. - Wyrzucone trichocysty tworzące sferę delikatnych niteczek ochronnych dookoła ciała wymoczka. Powiększenie około 1400 x.

Fot. 2.

Fot. 3.

Fot. 2. - Wymoczek w 0,040 % roztworze kwasu. Brak widocznych zmian struktury. Powiększenie około 400 x.

Fot. 3. - Wymoczek w 0,050 % roztworze kwasz. Spęcznienie komórki, ściemnienie niektórych części plazmy i wystąpienie jej ziarnistości. Powiększenie około 400 X.