

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXI, 8

SECTIO C

1966

Z Katedry Zoologii Systematycznej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS  
Kierownik: doc. dr Sędzimir M. Klimaszewski

i Pracowni Protozoologii  
Kierownik: dr Janina Wolska

Krystyna BOCHEN i Janina WOLSKA

Hodowla *Mayorella vespertilio* (Penard)

Культура *Mayorella vespertilio* (Penard)

The Cultivation of *Mayorella vespertilio* (Penard)

Korzystne dla obserwacji cechy morfologiczne i dostępność gatunku *M. vespertilio* (Penard) sprawiły, że stał się on przedmiotem naszych badań. Chodziło nam o to, aby opracować metody hodowli takiego gatunku pełzaka, który służyłby głównie do celów dydaktycznych. Wstępne próby hodowli wykazały, że jest on odporny na wahania temperatury (od 14° do 22°C), kwasowości (od 4,5 do 6,5) i dobrze rozmnaża się na płynnym podłożu nieorganicznym.

Źródłem materiału była woda pobrana wraz z mułem ze stawu na Czechówku w Lublinie. Hodowle czyste (od jednego osobnika troficznego) prowadzone były w stawkach parafinowych na szkiełkach podstawowych umieszczonych w komorze wilgotnej o temperaturze pokojowej (od 18° do 20°C). Zastosowano 5 pożywek: wg Chalkleya (5), Hahnerta (3), Knopa (5), Paca i Beldy (6) oraz powszechnego płynu Ringera. Najlepsze okazały się dwie pierwsze. Hodowle prowadzone na nich były przejrzyste i nie wymagały częstego odświeżania środowiska (co 10 dni). W tych samych pożywkach hodowano również *Chilomonas paramaecium* Ehrenberg, którym odżywiały się ameby. Hodowli tych wiciowców dokonywano w szalkach Petriego (6 cm średnicy) w 5 cm<sup>3</sup> płynu. Gdy liczba ameb była wystarczająco duża (ok. 100 osobników), przenoszono je do kolbki o poj. 15 ml w 5 ml pożywki i dokarmiano co 20 dni *Chilomonas paramaecium* E.

Jeśli chodzi o pokarm roślinny, to bardzo dobre okazały się zielenice z gatunku *Chlorococcum humicolum* Rab. i *Ankistrodesmus falcula* Brunnth. Nie wymagają one żadnych zabiegów związanych z hodowlą i dodane do pożywki Chalkleya czy Hahnerta z kilkoma ziarnami ryżu rozmnażają się bardzo szybko. W tym

przypadku hodowle *M. vespertilio* (P.) prowadzone były w szalkach Petriego i odświeżane co 2 miesiące.

Obserwacje przyżyciowe dokonywane były na podstawowych szkiełkach hodowlanych w stawkach parafinowych. Po odciążeniu nadmiernej ilości pożywki i usunięciu krążka parafinowego, hodowle były utrwalane płynem Schaudinna i barwione hematoksyliną żelazową wg Heidenheina lub hematoksyliną Böhmera.

#### OBSERWACJE I DOŚWIADCZENIA

W czasie trwania hodowli *M. vespertilio* (P.) — ryc. 1 — dokonano szeregu obserwacji i eksperymentów tempa rozrodu, sposobu pobierania i trawienia pokarmu, encystacji, ekscystacji, jak również zmiany kształtu pseudopodiów w zależności od pH środowiska.

1. Tempo rozrodu. W dobrze prosperującej hodowli ameby ulegają podziałowi co 3—4 dni. Po przeniesieniu do świeżej pożywki pierwszy podział nie następował nigdy wcześniej, jak po upływie 4 dni. Tabela 1 zawiera dane z hodowli prowadzonych przez 1 miesiąc. Cyfry dotyczące liczby i wielkości ameb są średnimi z 10 równolegle prowadzonych hodowli, których pH wynosiło 6,5, a temperatura wahała się w granicach od 18° do 20°C.

Tab. 1. Hodowla *M. vespertilio* (P.) w pożywce Chalkleya  
(jako pożywienie *Ch. paramecium* Ehr.)

The cultivation of *M. vespertilio* (Penard) on the medium prepared according to Chalkley (*Ch. paramecium* Ehr. supplied as food)

Dzień hodowli Day of cultivation	1	4	8	12	16	19	23	27	30
Liczba osobników Number of individuals	1	2	4	7	14	28	54	106	210
Wielkość (dł. x szer.) Size in $\mu$ (length x breadth)	x 96 x 48	x 94 x 47	x 96 x 47	x 96 x 49	x 96 x 49	x 94 x 47	x 96 x 47	x 96 x 48	x 96 x 43

Wyraźny wpływ na tempo rozrodu *M. vespertilio* (P.) wywiera temperatura środowiska. Jak się okazało, w temp. 14°C ameby nie rozmnażały się, ruch ich był wyraźnie zwolniony i pobierały znacznie mniejszą ilość pokarmu. W temperaturach wyższych (od 18° do 20°C) rozmnażały się dobrze (tab. 1), wykazywały dużą ruchliwość i intensywnie odżywiały się. Podwyższeniu temperatury do +28°C towarzyszyło w pierwszych 10 dniach zwiększenie ruchu i tempa podziałów. Wymiary ciała uległy zmniejszeniu (średnia wielkość 80  $\mu$   $\times$  40  $\mu$ ). W następnych 6 dniach ameby wykazywały znacznie mniejszą żywotność pod każdym względem (ruch, odżywianie, podziały). W 17 dniu od założenia hodowli wszystkie

osobniki zginęły. Jak wynika z tych danych, optimum temperatury dla *M. vespertilio* (P.) wynosi od 18° do 20°C.

2. Sposób pobierania i trawienia pokarmu. Na podstawie licznych obserwacji stwierdzono, że *M. vespertilio* (P.) pochłania „wybrane” ofiary (jeśli chodzi o pokarm zwierzęcy). W hodowlach dzikich zaobserwowano, że poraża wiele gatunków mniejszych orzęsków i wiciowców, ale odżywia się jedynie gatunkiem *Ch. paramaecium* Ehr. Unieruchomiona ofiara zostaje otoczona pseudopodiami, a następnie wciągnięta do endoplazmy. Wewnątrz ciała ameby wiciowiec wykazuje stopniowo zmniejszającą się aktywność ruchu, która ustaje po upływie kilku minut. Trawienie pokarmu trwa ok. 15 min., po czym rozłożona substancja rozprasza się w cytoplazmie (ryc. 3). W podobny sposób proces ten przebiega w przypadku pokarmu roślinnego. W czasie trawienia obserwowano intensywną działalność wodniczek tętniących, zmniejszenie liczby pseudopodiów i zwolnienie ruchów.

3. Encystacja i ekscystacja. Dla wywołania encystacji stosowano różne bodźce, jak: zmiana kwasowości, temperatury, środowiska (inny skład chemiczny), głodzenie i nadmiar pokarmu (1, 2, 4, 7). Przeprowadzane miesięczne próby nie dały pozytywnych rezultatów. I tak przy stosowaniu głodzenia i nadmiaru pokarmu ameby przeżywały lub ginęły bez żadnych objawów do tworzenia cyst; przy zmianie kwasowości zmieniały jedynie kształt pseudopodiów; po przeniesieniu do innego środowiska zaokrąglaly się i ginęły.

Obserwacji przebiegu encystacji dokonano podczas przeglądania starej, nie odświeżanej przez 6 miesięcy hodowli, prowadzonej na pożywce Chalkleya z *Ch. paramaecium* Ehr., a przechowywanej w kolbce uszczelnionej korkiem z waty. Kultura ta była przechowywana w temp. od 18° do 20°C na świetle. W momencie stwierdzenia pojedynczych cyst kwasowość hodowli wynosiła 6,0 i zawierała martwe i żywe osobniki *Ch. paramaecium* Ehr. Po upływie kilku dni wszystkie ameby encystowały. W tych samych warunkach cysty przetrwały okres 3 miesięcy, po czym zginęły.

Przebieg encystacji wyglądał następująco: osobnik troficzny na okres ok. 2 godz. przed wytworzeniem cysty nie przyjmował pokarmu, wręcz przeciwnie, wydalał do środowiska elementy zapasowe, na skutek czego wielkość jego ulegała wyraźnemu zmniejszeniu. Wykazywał coraz mniejszą aktywność ruchu, przy czym pseudopodia stawały się coraz krótsze i bardziej zaokrąglone. W momencie zaniku pseudopodiów zaokrąglona ameba wytworzyła widoczną, dobrze zarysowaną błonę. Równocześnie z pojawieniem się coraz to grubszej błony, wydzielona została śluzowata substancja, której obecność zawsze świadczy o jej życiu.

W celu doprowadzenia do ekscystacji cysty *M. vespertilio* (P.) zostały umieszczone na szkiełku hodowlanym w świeżej pożywce Chalkleya. Proces ten nastąpił po kilku dniach i przebiegał w sposób następujący (ryc. 2): początkowo nieruchome wewnątrz cysty zaczęło wykazywać coraz to wyraźniejszy ruch plazmy. Po upływie ok. 30 min. śluzowata otoczka cysty zanikła, a pozostała błona zaczęła w jednym miejscu jaśnieć i cienieć, w następstwie czego w tym miejscu wytworzyło się pierwsze pseudopodium, zrazu płatowate, a potem stożkowate. W ten sposób w różnych miejscach cysty powstawały kolejno następne pseudopodia, przy których pomocy ameba zaczęła powoli pełzać. Wymiary ekscystowanego trofozoita wynosiły  $76 \mu \times 30 \mu$ , natomiast średnica cysty —  $54 \mu$ .

3. Zmiana kształtu pseudopodiów. Przy próbie wywołania encystacji *M. vespertilio* (P.) zmianą kwasowości z 6,5 na 4,5 (rozcieńczony HCl) zauważono, że wszystkie pełzaki zatraciły charakterystyczny dla nich kształt pseudopodiów. Ze stożkowatych stały się płatowate (ryc. 4). Proces zmian pseudopodiów przebiegał następująco: w pierwszym momencie ameby skurczały się (przy wzmożeniu ruchu plazmy) i w czasie godziny wszystkie pseudopodia były kształtu lobopodiów. Przy obniżeniu kwasowości środowiska (rozcieńczony NaOH) nastąpił powrót do stanu pierwotnego i wszystkie pseudopodia z płatowatych stały się znów stożkowate.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Darby H. H.: The Effect of the Hydrogen-ion Concentration on the Sequence of Protozoan Forms. Arch. Prot., Bd. 65, 1929.
2. Doflein F.: Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. Arch. Protistenk. Suppl. I, 1907.
3. Hahnert W.: Studies on the Chemical Needs of *Amoeba proteus*: a Culture Method. Biol. Bull., 62, 1932.
4. Hartmann M.: Praktikum der Protozoologie. Jena 1921.
5. Cudo R. R.: Protozoology. Springfield Illinois U. S. A. 1954.
6. Pace D. M. and Belda W. H.: The Effect of Food Content and Temperature on Respiration in *Pelomyxa Carolinensis* Wilson. The Biol. Bull., vol. 86, 1944.
7. Wagten donk W. J.: Encystment and Excystment of Protozoa. Biochemistry and Physiology of Protozoa, vol. II, New York 1955.

#### РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы было установление таких методов культуры *Mayorella vespertilio* (Penard), которые можно было бы применять в наиболее простых лабораторных условиях.

Объектом исследований является вид *Mayorella vespertilio* (P), характеризующийся хорошими, с точки зрения наблюдателя, морфологическими признаками.

Чистые культуры проводились на парафиновых пластинках во влажной камере. После достижения соответствующей численности, колонии переносились в колбы емкостью 15 мл, содержащие 5 мл питательной среды.

В исследованиях употреблялось пять питательных сред, из них две оказались наилучшими (Chalkleya, 5, Hahnert, 3). В качестве питательного материала животного происхождения служили клетки *Chilomonas paramecium* Ehrenberg. Растительный питательный материал состоял из *Chlorococcus humicolum* Rab. и *Ankistrodesmus falcu* Brunth.

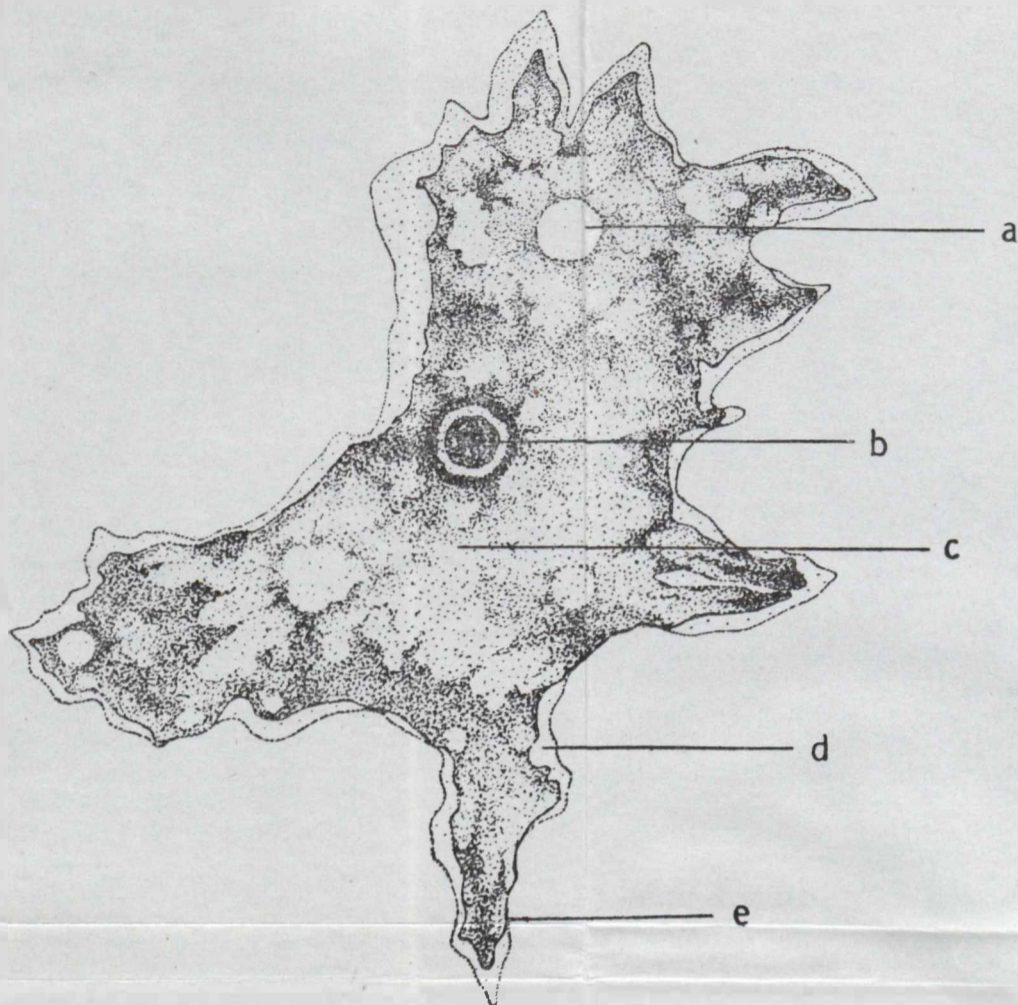
В ходе работы авторы провели ряд наблюдений относительно скорости размножения этой амебы, питания и пищеварения, энцистации и экзоцистации, а также относительно влияния изменений pH среды.

#### S U M M A R Y

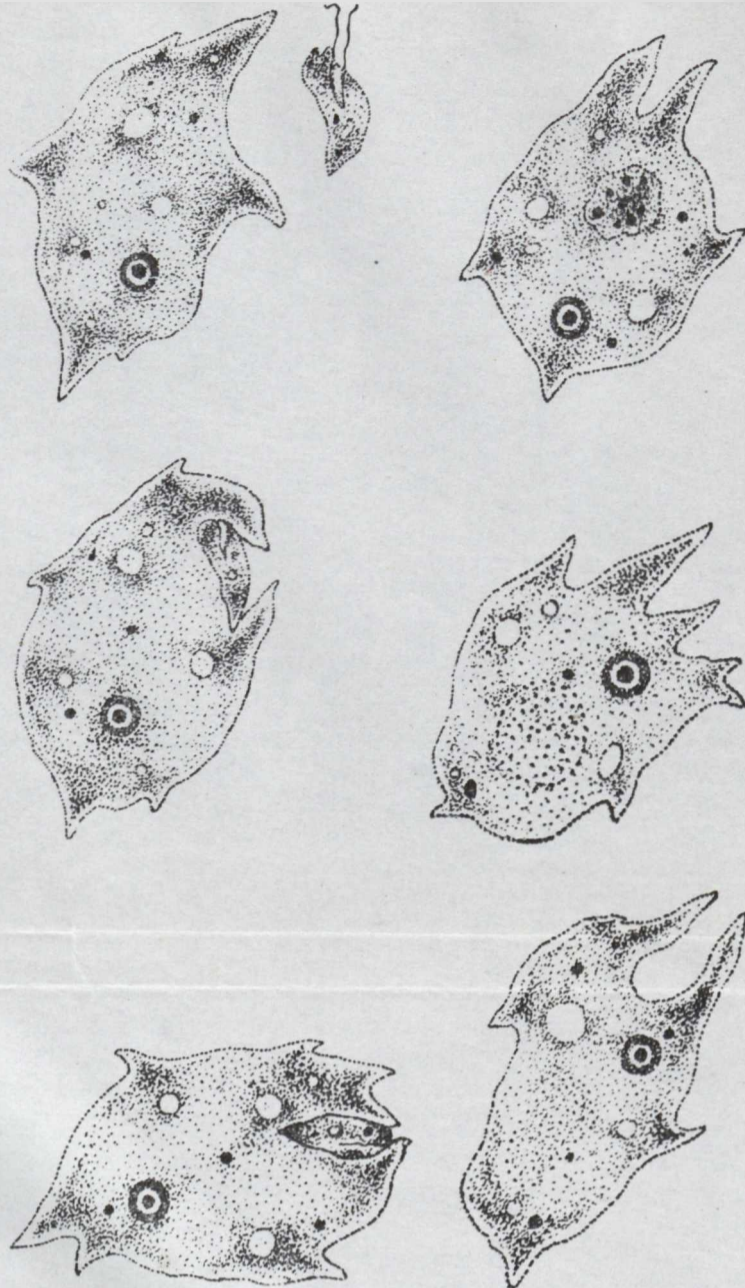
The aim of the present paper was the selection of such methods of growing *Mayorella vespertilio* (Penard) that could be applied in the simplest laboratory conditions. The authors chose *Mayorella* (P.) for cultivation because this species was readily available and its morphological properties could be easily observed. Pure culture (obtained from one trophozoite) were developed in small ponds, surrounded by chemically pure paraffin, in a damp chamber. After reproduction the amoebas were transferred to tubes of 15 ml in volume, with 5 cm<sup>3</sup> of the medium per tube.

Out of five unorganic media used, two of them proved most suitable: that prepared according to Chalkley (5) and that according to Hahnert (3). *Chilomonas paramecium* Ehrenberg was used as animal food and *Chlorococcus humicolum* Rab. and *Ankistrodesmus falcu* Brunth as plant food.

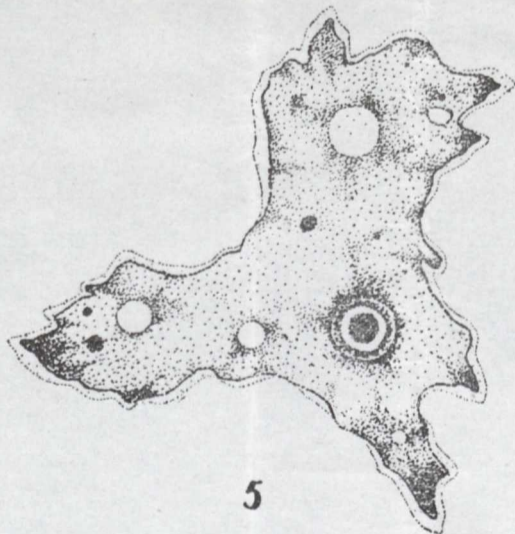
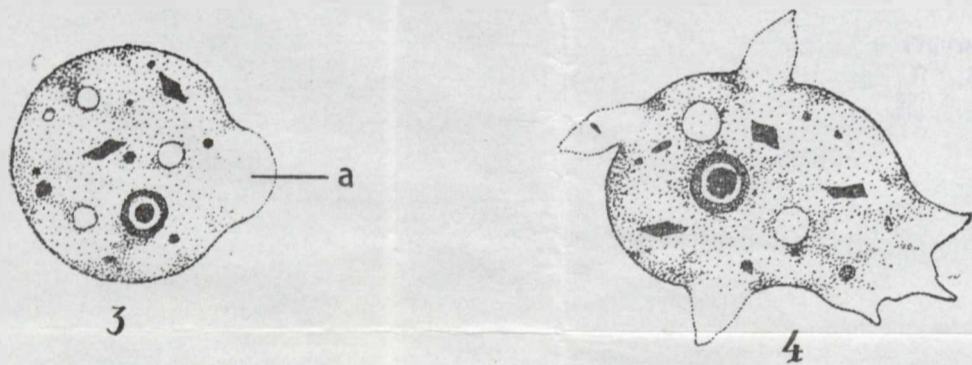
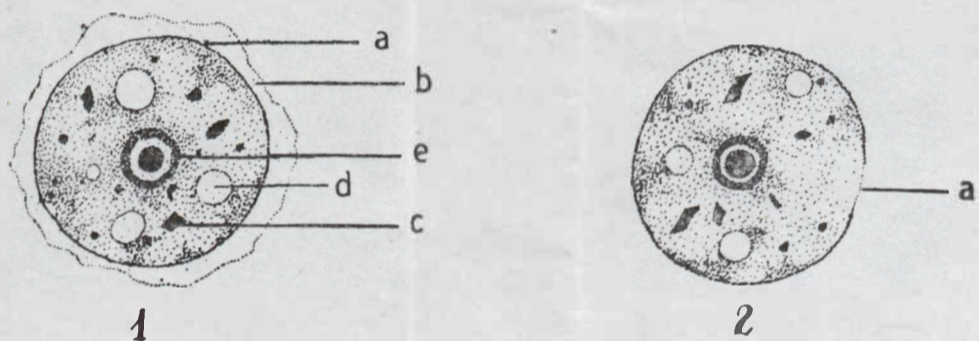
During the cultivation period the authors made many observations concerning the rate of reproduction, intake of food, the process of digestion, encystment and excystment, and the changes in the shape of the pseudopodia under the influence of varying pH of the medium.



Ryc. 1. *Mayorella vespertilio* (Penard) z hodowli (oryg.); a — wodniczka tętniąca, b — jądro, c — endoplazma, d — ektoplazma, e — pseudopodium stożkowe  
*Mayorella vespertilio* (Penard) obtained from the culture; a — contractile vacuole, b — nucleus, c — endoplasm, d — ectoplasm, e — conical pseudopodium

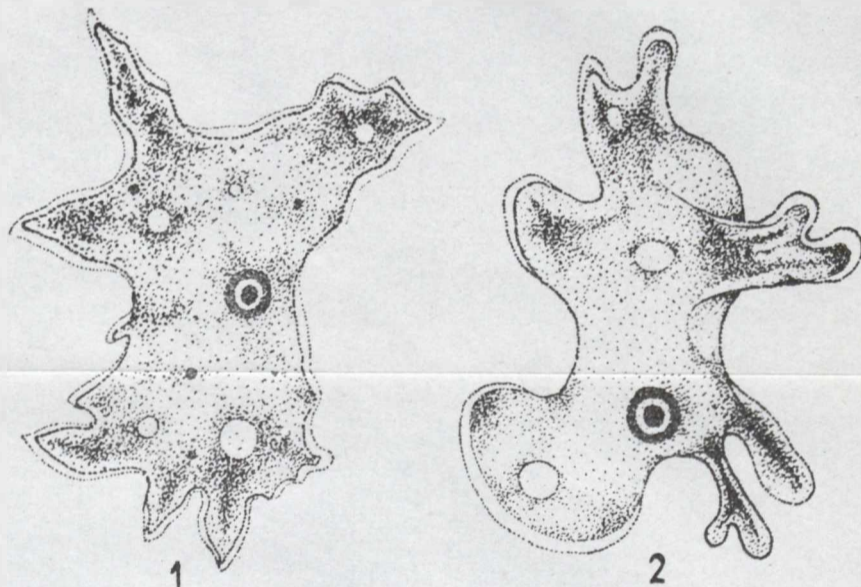


Ryc. 3. Proces pobierania i trawienia pokarmu przez *M. vespertilio* (P.) (oryg.)  
 The intake and digestion process in *M. vespertilio* (Penard)



Ryc. 2. Ekscystacja *Mayorella vespertilio* (Penard) — (oryg.); 1 — cysta dojrzała: a — błona, b — osłonka śluzowa, c — kryształ, d — wodniczka tętniąca, e — jądro, 2 — początek ekscystacji: a — zanikająca błona, 3 — późniejsze stadium ekscystacji: a — pierwsze płatkowate pseudopodium, 4 — końcowe stadium ekscystacji, 5 — forma troficzna

Excystment of *Mayorella vespertilio* (Penard); 1 — mature cyst, a — membrane, b — gelatinous envelope, c — crystal, d — contractile vacuole, e — nucleus, 2 — beginning of encystment; a — disintegrating membrane, 3 — late stage of excystment: a — first lobopodia, 4 — final stage of excystment, 5 — trophozoite form



Ryc. 4. Zmiana pseudopodiów *M. vespertilio* (P.) pod wpływem zmiany kwasowości środowiska (oryg.); 1 — pseudopodia przy pH 6,5, 2 — pseudopodia przy pH 4,5  
 Changes in the shape of *M. vespertilio* (Penard) under the influence of varying pH of the medium; 1 — pseudopodia at pH 6.5, 2 — pseudopodia at pH 4.5