

ANDRZEJ GRĘBECKI

O STANACH NIEDOGĘSZCZENIA I PRZEGĘSZCZENIA
W KULTURACH *PARAMECIUM CAUDATUM*Zakład Biologii Ogólnej Instytutu im. M. Nenckiego
Warszawa

W nowoczesnej ekologii powszechnie przyjęła się teza Alleego (1931, 1934, 1938 i 1941), że zarówno niedogęszczenie, jak i przegęszczenie populacji wpływa ujemnie na jej rozwój. A więc w przypadku populacji niedogęszczonej zwiększenie gęstości sprzyja rozwojowi, a w przypadku populacji przegęszczonej — hamuje go. Twierdzenie to sprawdzone na różnych populacjach zwierzęcych nie było do tej pory zweryfikowane na przykładzie kultur pierwotniaczych.

Protozoologia eksperymentalna dysponuje licznymi faktami przemawiającymi za istnieniem wzajemnego hamującego wpływu osobników w obrębie kultury. Tezę tę potwierdza powszechnie znany fakt załamywania się krzywych wzrostu liczebnego hodowli po osiągnięciu przez nie określonego poziomu rozwojowego. Pierwszy na zjawisko to zwrócił uwagę Maupas (1886 i 1888). Najpełniej opracowali je Buchanan i Fulmer (1928) na materiale mikrobiologicznym, wyróżniając siedem zasadniczych faz rozwoju kultury bakteryjnej, a w protozoologii dane ich potwierdził Loeffler (1936) na *Paramecium bursaria*. Najwspółczesniejsze syntetyczne omówienie tych zjawisk podaje Hall (1941).

Równocześnie jednak protozoologia dostarcza poważnego materiału, przemawiającego za istnieniem stymulującego oddziaływania na siebie poszczególnych osobników w hodowli pierwotniaczej. Zgromadził go Robertson (1908, 1921, 1922, 1923, 1924 a, b, c). Twierdzi on, że dwa *Enchelys* lub dwa *Colpidia* umieszczone w kropli pożywki dzielą się w przybliżeniu dwukrotnie szybciej, niż osobniki pojedyncze przebywające w tej samej objętości cieczy. A zatem w dotychczasowym stanie zagadnienia stymulującego czy hamującego wzajemnego wpływu osobników w hodowli pierwotniaczej dostrzegamy sprzeczności i sprawa ta wymaga rewizji doświadczalnej w poszukiwaniu ewentualnego ujawnienia się prawidłowości ogólnej, wykrytej przez Alleego.

Przeprowadzono doświadczenia kontrolujące na *P. caudatum* podstawowe eksperymenty Robertsona (1921). Wymoczki były umieszczone na szkiełkach zegarkowych w 0,1 ml cieczy pochodzącej z odwirowanej bardzo rzadkiej kultu-

ry pantofelków, o pH nieco niższym od 6,8. Każde szkiełko umieszczone w oddzielnej małej komorze wilgotnej i wstawione do termostatu o temperaturze 25°C. Doświadczenie prowadzono w trzech równoległych seriach, z których każda liczyła 50 próbek. W pierwszej serii na każdym szkiełku przebywał jeden wymoczek, a w drugiej – dwa wymoczki. W serii trzeciej umieszczone razem były również dwa wymoczki, lecz były to osobniki siostrzane pochodzące z podziału osobnika macierzystego, który okres przed podziałem spędził w tej samej kropli środowiska hodowlanego. Przez trzy doby notowano co 12 godzin ilość wymoczków na wszystkich szkiełkach użytych w eksperymencie. Wyniki średnie podaje tabela I.

Tempo podziałów pantofelków umieszczonych pojedynczo i po dwa w izolowanych kroplach płynu hodowli
Fission rate of a paramecia placed singly or twos in isolated drops of culture medium

Tab.1

Godziny Hours	Ilość pantofelków otrzymanych z: Number of paramecia obtained from:		
	pojedynczego single	dwóch obcych two strange individuals	dwóch siostrzanych two sister individuals
–	–	–	1,0
0	1,0	2,0	2,0
12	1,3	3,2	3,3
24	1,9	5,0	5,2
36	2,6	7,9	8,2
48	3,7	11,2	12,0
60	5,5	16,3	17,6
72	8,1	22,9	24,3

Jak się okazało, wymoczki pojedyncze rzeczywiście rozmnażają się wolniej. Z dwóch wymoczków otrzymujemy po 72 godzinach prawie trzy razy tyle osobników co z jednego, a nie dwa razy tyle, jak to wynikałoby z prostego przeliczenia. Przy tym u osobników siostrzanych obserwujemy nieco silniejsze przyspieszenie tempa podziałów, niż u osobników obcych. Jednak nawet w tym wypadku nie zdarza się czterokrotna przewaga liczebna nad potomstwem osobnika pojedynczego, jaką u *Enchelys* i *Colpidium* obserwował Robertson (1921). Na niektórych szkiełkach działania stymulującego nie można było w ogóle zauważyć, na innych było ono bardzo wyraźne, przeciętnie jednak w obu seriach przewaga liczebna była w przybliżeniu trzykrotna, czemu odpowiada przyspieszenie tempa podziałów o 50%. Mimo nie uzyskania wyników tak wysokich jak wyniki Robertsona (1921), należy zgodzić się z jego zasadniczym wnioskiem, że tempo mnożenia się wymoczków rośnie w razie obecności innych wymoczków.

W dalszych doświadczeniach zastosowano hodowle masowe. Eksperymenty rozpadły się na dwa etapy: wpływ zagęszczenia hodowli na intensywność procesów życiowych mierzony tempem zużytkowywania, pokarmu oraz wpływ zagęszczenia na wzrost hodowli, mierzony zmianami liczebności pierwotniaków.

W pierwszym etapie hodowle przygotowywano w pięciu różnych seriach: a) 1000 ml cieczy zawierającej 100 osobników na 1 ml, b) 200 ml o gęstości 500 osobników w 1 ml, c) 100 ml o gęstości 1000 osobników w 1 ml, d) 50 ml kultury zawierającej 2000 osobników na 1 ml, oraz e) 20 ml kultury o gęstości 5000 osobników w 1 ml. W efekcie każda hodowla zawierała w momencie wyjściowym 100 000 pantofelków. W obrębie każdej serii poszczególne kultury były karmione zawiesiną mleka w proszku, albo zawiesiną suszonego żółtka jaja kurzego, albo pożywką sianową. Pożywkę mlekową przygotowywano w stosunku 2,5 g mleka w proszku na 100 ml wody, żółtkową zaś w stosunku 1 g suszonego żółtka na 100 ml wody. Dla otrzymania pożywki sianowej gotowano przez 5 minut od początku wrzenia 5 g suchego siana w 1000 ml wody i zakażano wywar jedną czą *Bacillus subtilis*, po czym odstawiano go na 3 dni do temperatury 25°C. Do każdej hodowli dodawano po 1 ml pożywki w przypadku pożywek mlekowej i żółtkowej, 10 ml zaś w przypadku pożywki sianowej. Ostatecznie więc uzyskano dla każdego typu pożywki pięć rodzajów kultur różniących się pomiędzy sobą: objętościami, zagęszczeniami wymoczków oraz stężeniami pożywek. Dla każdej kombinacji doświadczenie powtarzano dziesięciokrotnie. We wszystkich przypadkach równe były: liczba absolutna wymoczków i dawka pokarmowa przypadająca na jednego osobnika. Notowano czas, w ciągu którego wymoczeki zużywały całkowicie pokarm, to znaczy czas odzyskania przez środowisko pełnej przejrzystości. Obserwacji dokonywano gołym okiem (tab. II).

Tempo zużywania pożywki mlekowej, sianowej i żółtkowej przez hodowle o różnej gęstości (wyniki wyrażone w dobach)

Rate of consumption of milk, hay, and egg yolk nutrients by cultures of differing density (results expressed in 24-hour periods)

Tab. II

Gęstość kultury (osobników/ml) Culture density (individuals per ml.)	100	500	1000	2000	5000
Pożywka mlekowa Milk nutrient	1,2	4,5	5,6	6,4	6,6
Pożywka żółtkowa Egg yolk nutrient	1,5	4,3	5,2	6,0	6,3
Pożywka sianowa Hay nutrient	0,8	3,7	4,5	5,5	5,8

Przytoczone dane zdają się wskazywać na to, że kultury zagęszczone zużytkują zasoby pokarmowe środowiska wolniej, niż kultury rzadkie. Wniosek

ten wymaga jednak staranniejszego udokumentowania, ponieważ opisywany eksperyment cechował znaczny prymityw metody ilościowej oceny badanego zjawiska. W związku z tym doświadczenie powtórzono, stosując wszystkie pięć rodzajów kultur, ale jako pożywki używano już wyłącznie sproszkowanego mleka. Przez 7 dni dokonywano codziennego pomiaru mętności odwirowanego środowiska przy pomocy nefelometru Pulfricha. Nie oznaczano mętności absolutnej i na tej podstawie stężenia pożywki, a każdorazowo oznaczano tylko mętność względną, skąd otrzymywano spadek koncentracji pożywki w stosunku do stężenia wyjściowego przyjmowanego za 100% (tab. III).

Procentowy spadek stężenia pożywki mlekowej w hodowlach o różnej gęstości (obliczany w stosunku do stężenia wyjściowego)

Percentage decrease in concentration of milk nutrient in cultures of differing density (calculated in relation to initial concentration)

Tab. III

Dnie Days	Gęstość hodowli – osobn./ml. Density of culture – (individuals per ml.)				
	100	500	1000	2000	5000
	%	%	%	%	%
0	100	100	100	100	100
1	43	62	68	71	72
2	11	36	39	43	43
3	—	18	24	30	32
4	—	7	9	12	13
5	—	—	3	6	7
6	—	—	—	2	4
7	—	—	—	—	—

Eksperyment wykonany ściślejszymi metodami wskazuje więc również, że tempo zużytkowywania pokarmu, a zatem prawdopodobnie także ogólne tempo procesów życiowych pantofelka nie rośnie, lecz maleje w miarę zagęszczania hodowli. Wniosek ten w świetle literatury, a zwłaszcza w zestawieniu z wynikami Chejfe ca (1929), może wydać się dość nieoczekiwany. Nie jest on jednak w pełni porównywalny z danymi dotychczasowymi, które dotyczyły albo hodowli osobniczych izolowanych na oddzielnych szkiełkach i karmionych w przeliczeniu na osobnika, albo hodowli masowych karmionych w przeliczeniu na jednostkę objętości cieczy. Natomiast w opisanym eksperymencie wprowadzono hodowle masowe karmione w przeliczeniu na osobnika.

W dalszych doświadczeniach obserwowano wzrost liczebny hodowli. Posłużono się ponownie opisanymi pięcioma rodzajami kultur mlekowych. Po 7 dniach obliczano ilości pantofelków przypadające na 1 ml cieczy oraz wyliczano, jaki procent ilości początkowej ta liczba stanowi. Wyniki przybliżone do 100 osobników na 1 ml podane są w tabeli IV.

Zmiany gęstości hodowli w zależności od gęstości wyjściowej (mierzone ilością osobników na 1 ml)

Changes in culture density depending on initial density (measured by number of individuals per 1 ml.)

Tab. IV

Po 7 dniach After 7 days	Gęstość hodowli wyjściowej Initial culture density				
	100	500	1000	2000	5000
Gęstość absolutna Absolute density	1300	2000	1600	1300	1200
% gęstości wyjściowej % of initial density	1300	400	160	65	24

Doświadczenie to jest w pewnym stopniu kontrolą poprzedniego eksperymentu. Pokazuje ono, że pierwotnie równe stosunki ilości wymoczków do zasobów pokarmu przesuwają się tym bardziej na niekorzyść pokarmu, im rzadsza jest kultura wyjściowa. Zmiana ta jest decydująca, wydaje się jednak, że niezależnie od tego przeciętny pojedynczy pantofelek żyjący w hodowli rzadszej szybciej zużywa pokarm.

Najważniejsze jest jednak to, że zagęszczenie hodowli nie sprzyja podziałom, lecz je hamuje. Wniosek ten początkowo wydaje się sprzeczny z rezultatami Robertsona (1921), które udało się powtórnie uzyskać. Prawdopodobnie sprzeczność polega na charakterze hodowli, które w pierwszym wypadku były osobnicze, a w drugim – masowe. Celem sprawdzenia tego przypuszczenia wykonano doświadczenie, w którym posłużono się metodyką Dimitrowej (1932), polegającą na stosowaniu samych środowisk hodowli. Działano na hodowle osobnicze filtratem hodowli masowych. Kontrolowano w ciągu 5 dni tempo mnożenia się wymoczków pojedynczych na szkiełkach zegarkowych w temperaturze 20°C. Poszczególne osobniki były umieszczane albo w wodzie wodociągowej albo w środowisku kultury liczącej 500 osobników w 1 ml, albo w środowisku kultury o gęstości 5000 osobników w 1 ml. Wymoczki karmiono mlekiem tylko na początku eksperymentu. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono w tabeli V.

Jak się okazuje, środowisko kultury o umiarkowanej gęstości daje lepszą podzielność w porównaniu z wodą wodociągową i środowiskiem kultury gęstej. Można więc zaproponować rozwiązanie sprzeczności zarysowującej się pomiędzy danymi przemawiającymi za oddziaływaniami stymulującymi oraz świadczącymi o wzajemnych hamujących oddziaływaniach osobników w kulturze pierwotniaczej.

Tempo podziału pantofelków umieszczanych pojedynczo w rozmaitych środowiskach
Fission rate of paramecia placed singly in different medium

Tab. V

Dnie Days	Środowisko Medium		
	wody wodociągowej tap water	kultury rzadkiej sparse culture	kultury gęstej dense culture
0	1,0	1,0	1,0
1	1,2	1,5	1,3
2	2,1	1,8	1,7
3	3,3	4,6	2,4
4	8,8	12,2	4,6
5	16,0	22,4	8,7

Wydaje się, że w przypadku hodowli *P. caudatum* trudno mówić o zawsze korzystnym, lub zawsze szkodliwym wpływie zagęszczania. Najprawdopodobniej istnieje jakieś optimum zagęszczenia kultury, a niekorzystne może być – na co już zwracał uwagę Allee (1931, 1934 i 1938) – zarówno przegęszczenie, jak i niedogęszczenie.

Specyficzny wpływ, jaki na wzrost liczebny kultury ma stopień jej pierwotnego zagęszczenia, musi być uwarunkowany działaniem jakichś określonych czynników. Dotychczas brak jednolitej ich koncepcji. Czynniki warunkujące hamujący wpływ przegęszczenia były częściowo przedmiotem zainteresowania badaczy tzw. „starzenia się kultur” (szczegółowe informacje u Halla 1941). Co do kultur niedogęszczonych rozpowszechniła się najbardziej hipoteza Robertsona (1923). Według niej pierwotniaki mają wydzielać do środowiska specjalne substancje stymulujące ich własny wzrost (substancje autokatalityczne) oraz stymulujące wzrost ich partnerów (substancje allelokatalityczne). Zatem czynnikiem warunkującym ujemny wpływ niedogęszczenia kultury byłby niedobór substancji autokatalitycznych i allelokatalitycznych w środowisku. Wobec tego za czynniki zagęszczenia hodowli uważa się raz zjawiska wynikające z ogólnego toku metabolizmu wymoczków, a drugi raz wydzielanie jakichś absolutnie specyficznych i nieznanych substancji.

Teorię Robertsona w części podtrzymała Dimitrowa (1932). Natomiast Cutler i Crump (1923 i 1925), Greenleaf (1924 i 1926), Meyers (1927), Petersen (1929), Di Tomo (1932) oraz Johnson i Hardin (1938) nie zdołali osiągnąć pełnego potwierdzenia danych Robertsona. Niektórzy próbowali wyniki Robertsona tłumaczyć bez wprowadzania pojęcia substancji katalizujących wzrost liczebny hodowli: Darby (1930) – zmianami pH, Jahn (1934) – zmianami potencjału redox, a Chejfec (1929) – stosunkami pokarmowymi w środowisku.

Kierunek interpretacji obrany przez trzech ostatnich autorów wydaje się naj-

słuszniejszy. Jeżeli rzeczywiście tzw. zjawiska autokatalityczne zależą od warunków środowiska, to powinny istnieć szanse naśladownictwa faktów opisywanych przez Robertsona na drodze stosowania optymalnych i możliwie stabilnych warunków środowiska, zamiast oddziaływania partnerów żyjących w tejże kropli pożywki. Dla sprawdzenia tego przypuszczenia przeprowadzono znaczną liczbę doświadczeń, polegających na trzydniowej hodowli izolowanych pantofelków w 0,1 ml cieczy. Zróznicowanie prób dotyczyło temperatury (od 18°C do 30°C), ilości pożywki, jej rodzaju (mlekowa, żółtkowa oraz wywary z siana, z sałaty lub z suszonych sprężnic), sposobu przyrządzania pożywki oraz pH (od 6,0 do 8,0). Środowiska były ściśle zbuforowane. W seriach pozostających w temperaturze 25°C, w pH wynoszącym od 6,8 do 6,9 i przy zastosowaniu jednej z pożywek mlekowych, otrzymano wyniki pozytywne. Jedna z takich serii liczyła 100 wymoczków na oddzielnych szkiełkach zegarkowych. Zatem – teoretycznie rzecz biorąc – po trzech dniach powinno się uzyskać 800 wymoczków, a w rzeczywistości było ich 1927. Przyspieszenie podziałów było więc – podobnie jak u Robertsona – więcej niż dwukrotne, a osiągnięte z wykluczeniem ewentualnej allelokatalizy. Warto dodać, że spośród 100 szkiełek na 16 było ponad 30 wymoczków, na 4 ponad 50, a na jednym – 73 wymoczki.

Jeżeli słuszne jest założenie, że odpowiednio dobrane warunki środowiska dają efekt identyczny, jak hipotetyczna allelokataliza, to w takim razie w wypadku optymalnych i stabilnych warunków środowiska zwiększenie wyjściowej liczby wymoczków na szkiełku nie powinno nadal wywierać stymulującego wpływu na podziały. Równoległe do serii doświadczalnej opisanej przed chwilą prowadzono dwie inne. Wymoczki pozostawały w takich samych warunkach, lecz było ich po 2 i po 4 na każdym szkiełku zegarkowym. Tym razem nie zaobserwowano żadnego przyspieszenia tempa podziałów w porównaniu z poprzednią serią, a wszelkie różnice mieściły się w granicach błędu.

Można zatem uważać, że niekorzystny wpływ niedogęszczenia kultury nie jest uwarunkowany niedoborem jakichś specyficznych substancji, a czynnikami niedogęszczenia są warunki środowiska. Nasuwa się więc przypuszczenie, że są to w ogóle czynniki zagęszczenia i że będą one decydowały również o niekorzystnym wpływie przegęszczenia kultury. Przypuszczenie to najlepiej sprawdzić, stosując w doświadczeniach kultury masowe, w których wprowadzi się sztuczną regulację fizykochemicznych właściwości środowiska i sztuczną gospodarkę zasobami pokarmowymi. O ile da się w ten sposób pokierować procesami tak zwanego „starzenia się” kultur, doświadczenie da odpowiedź pozytywną.

W klasycznej kulturze „zamkniętej”, gdzie wymoczki są po prostu umieszczone w zwykłym naczyniu, można regulować zasoby pokarmowe, nie można jednak ściśle regulować fizykochemicznych właściwości środowiska. Aby to osiągnąć, wprowadzono hodowlę pierwotniaków w specjalnych naczyniach szklanych własnej konstrukcji, które nazwano naczyniami przepływowymi (fig. 1).

Wymoczki są hodowane w 50-mililitrowym naczyniu D. Do wtopionej w nie wygiętej rurki C kapią krople świeżej pożywki. Pożywka ta zmagazynowana jest

w butli A, skąd wypływa przez rozdzielacz B. Rozdzielacz zakończony jest rurką silnie zwężoną na końcu i zaopatrzoną w kranik. Urządzenie to pozwala wkraplać do hodowli określoną ilość płynu w określonym czasie. Świeże środowisko hodowlane dyfunduje do zbiornika z wymoczkami (D) od jego dna. Stare środowisko (nadmiar płynu) wciąż przelewa się na powierzchnię hodowli do otwartego wylotu rurki wypływowej G i gromadzi się w zbiorniku E. Górny otwór rurki wypływowej G zabezpieczony jest filtrem F zatrzymującym wymoczkę, ale przepuszczającym płyn hodowlany i zawieszoną pożywkę. Filtr taki można dobrać z serii bibułek filtracyjnych, a zakłada się go na rurkę G w kształcie kapturka. Niewygodą urządzenia jest ciągle zatykanie filtru przez występujące w hodowli śluzę, tak że trzeba go bardzo często zmieniać. Zaletą naczynia przepływowego jest w pierwszym rzędzie możliwość nieprzerwanego odświeżania płynu hodowlanego. Prócz tego, dobierając odpowiednio własności cieczy wkraplanej, można osiągnąć zarówno stałość, jak i dowolne zmiany właściwości środowiska hodowli. Przy tym wszelkie takie zmiany dzięki stopniowemu wkraplaniu i dyfuzji zachodzą w sposób płynny, a nie raptownie, jak to ma miejsce przy odświeżaniu kultury zamkniętej. Równocześnie, znając czas potrzebny dla dokonania się pełnej wymiany płynu hodowlanego w naczyniu D, można przez porównanie własności cieczy wkraplanej i wypływającej z urządzenia wnosić o działalności wymoczków, jak na przykład o zużyciu pokarmu, lub o oddziaływaniach na chemizm środowiska.

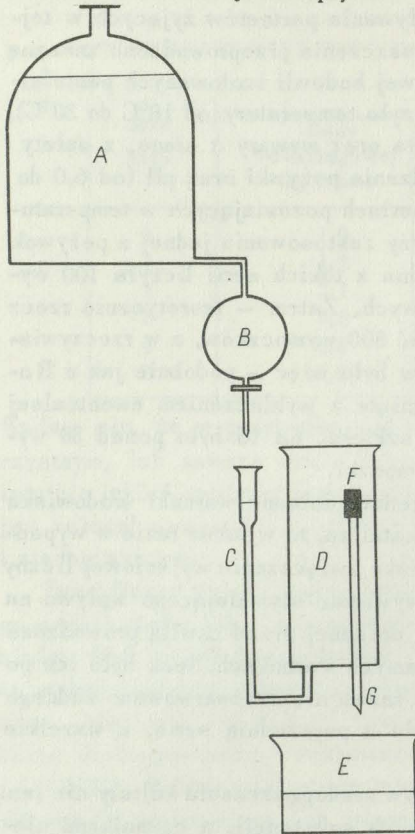


Fig. 1. Schemat naczynia przepływowego

A — Butla z pożywką, B — rozdzielacz,
C — rurka wlotowa, D — naczynie hodowlane,
E — zbiornik na ciecz wypływającą, F —
filtr, G — rurka wypływowa

Diagram of throughflow apparatus

A — bottle with nutrient, B — separator,
C — inflow-tube, D — culture vessel,
E — outflow collector, F — filter, G — outflow
tube

Celem skontrolowania działania przyrządu oraz celem uzyskania informacji niezbędnych do dalszych doświadczeń obliczano dawki pokarmowe dla różnych kultur. Określano, jakie najwyższe stężenie pożywki jest jeszcze całkowicie konsumowane przez daną kulturę (ciecz wypływająca jest klarowna), jeżeli przez aparat przepływa w ciągu doby 500 ml płynu, czyli środowisko hodowli jest w ciągu doby odświeżane dziesięciokrotnie. Okazało się, że hodowla o gęstości 100 osobników na 1 ml zużywa całkowicie

zawiesinę mleka w proszku o stężeniu odpowiadającym w przybliżeniu 0,0001%, o gęstości 500 osobników na 1 ml – 0,0004%, o gęstości 1000 osobników – 0,0007%, o gęstości 2000 osobników na 1 ml – 0,0012% a kultura o gęstości 5000 osobników na 1 ml – 0,0025%.

Doświadczenie to marginesowo potwierdziło wysunięty już uprzednio wniosek, że w hodowlach masowych silne zagęszczenie nie sprzyja użytkowaniu pokarmu.

Do analizy czynników przegęszczenia kultur masowych posłużono się zarówno zwykłymi hodowlami zamkniętymi, jak i hodowlami w naczyniach przepływowych. Badania przeprowadzono w czterech seriach zawsze od kultur o objętości globalnej 50 ml i zawierających 100 wymoczków w 1 ml. Co 3 dni obliczano aktualną gęstość kultury. Hodowle utrzymywano do chwili wyraźnego załamania się ich wzrostu liczebnego. Środowiska kultur nie były zbuforowane, a ich pH wyjściowe wahało się około 7.

W pierwszej serii przygotowano 10 hodowli zamkniętych w zlewkach szklanych. Hodowle te nakarmiono tylko na początku eksperymentu, używając na każdą 50 mg sproszkowanego mleka (tab. VI).

Wzrost liczebny hodowli hamowanej pokarmowo i fizykochemicznie
Growth of culture subject to food deficiency and to physico-chemical inhibition

Tab. VI

Nr hodowli No. of culture	Gęstość hodowli po dniach Density of culture after days			
	3	6	9	12
1	368	1057	1962	1579
2	372	982	2186	1399
3	456	995	2025	1481
4	418	981	2063	1550
5	497	1107	2210	1102
6	303	912	1908	1585
7	394	864	1852	1761
8	481	960	2037	1462
9	440	989	1914	1412
10	481	1023	2243	1528
Średnia Average	421	987	2030	1468

Jak widać, hodowle te osiągają maksymalną gęstość dochodzącą do 2000 osobników w 1 ml około dziewiątego dnia doświadczenia, po czym ich rozwój załamuje się.

W serii drugiej przygotowano również 10 hodowli w zlewkach, lecz dokarmiano je zawsze, ilekroć nastąpiło zużycie pokarmu. Zatem w porównaniu z kulturami pierwszej serii, których rozwój narażony był zarówno na hamowanie przez

deficyt pokarmowy, jak i przez fizykochemiczne zmiany środowiska, kultury drugiej serii mogły napotkać jedynie drugi rodzaj hamowania. Wyniki pomiarów ich liczebności podaje tabela VII.

Wzrost liczebny hodowli hamowanej fizykochemicznie
Growth of culture subject to physico-chemical inhibition

Tab. VII

Nr hodowli No. of culture	Gęstość hodowli po dniach Density of culture after days						
	3	6	9	12	15	18	21
1	485	805	1701	2815	3698	3542	2350
2	423	763	1623	2705	3487	3673	2482
3	476	791	1651	2793	3584	3596	2409
4	468	770	1679	2810	3631	3578	2394
5	519	836	1782	2917	3871	3204	2208
6	484	808	1665	2788	3542	3607	2424
7	540	819	1683	2853	3643	4053	2872
8	509	800	1676	2811	3673	3560	2371
9	492	794	1592	2692	3550	3691	2502
10	574	834	1788	2946	3924	3246	1984
Średnia Average	497	802	1684	2813	3660	3575	2396

Dane liczbowe wskazują na lepszy rozwój kultur drugiej serii. Załamanie rozwoju następuje po okresie względnej równowagi dopiero pomiędzy 15 a 18 dniem doświadczenia, przy czym gęstość kultur przekracza 3500 osobników w 1 ml.

Hodowle trzeciej serii były prowadzone w 10 naczyniach przepływowych. Przez każdą hodowlę przepływało w ciągu doby 500 ml pożywki, zawierającej globalnie 12,5 mg sproszkowanego mleka. A więc w hodowlach trzeciej serii była wykluczona ewentualność hamowania rozwoju przez fizykochemiczne zmiany środowiska, lecz ograniczone były zasoby pokarmu, bo jego dobowa dawka była stała i odpowiadała zapotrzebowaniu hodowli liczącej około 5000 osobników w 1 ml (tab. VIII).

Jak się okazuje, hodowle tej serii osiągają najwyższą liczebność również około 15 dnia doświadczenia, ale gęstość ich sięga wówczas prawie 6000 osobników w 1 ml. Występuje przy tym inne ciekawe zjawisko przedstawione w formie schematu na rysunku 2. Dolny rząd słupków ilustruje mierzoną co 3 dni liczebność wymoczków, rząd górny zaś wyniki codziennych nefelometrycznych pomiarów stężenia pożywki wpływającej z naczynia przepływowego, czyli codzienną rezerwę (nadmiar) pokarmu. Okazuje się, że zasoby pokarmowe wyczerpują się nieco szybciej, niż załamuje się rozwój kultury. Jeśli dodać do tego, że kultury osiągnęły przejściowo gęstość przewyższającą 5000 osobników w 1 ml, na którą

była obliczona dobową dawką pokarmu, otrzymamy interesujący przykład „opóźnionego” reagowania kultury na zmiany zachodzące w jej środowisku.

Wzrost liczebny hodowli hamowanej pokarmowo
Growth of culture inhibited by food deficiency

Tab. VIII

Nr hodowli No. of culture	Gęstość hodowli po dniach Density of culture after days					
	3	6	9	12	15	18
1	497	1184	2116	3570	5802	3981
2	530	1269	2300	3785	5871	3926
3	511	1217	2204	3617	5752	4042
4	497	1199	2187	3521	5702	4033
5	523	2280	2306	3792	5915	4118
6	525	1132	2135	3797	5945	3868
7	519	1223	2225	3718	5780	4005
8	517	1210	2156	3575	5710	3998
9	516	1233	2242	3691	5803	3967
10	525	1263	2309	3774	5890	3812
Średnia Average	516	1221	2218	3684	5817	3975

10 hodowli badanych w serii czwartej różniło się od hodowli z serii trzeciej tylko tym, że dobową dawkę pokarmową systematycznie zwiększano, ilekroć zauważono, że poprzednia staje się niewystarczająca. A zatem były to hodowle, w których starano się eliminować oba typy hamowania rozwoju. Zmiany ich podane są w tabeli IX.

Wzrost liczebny hodowli bez hamowania
Growth of culture not subject to inhibition

Tab. IX

Nr hodowli No. of culture	Gęstość hodowli po dniach Density of culture after days							
	3	6	9	12	15	18	21	24
1	517	1504	3516	5324	6808	7295	7293	7451
2	548	1563	3500	5384	6865	7354	7186	7580
3	500	1471	3423	5268	6797	7118	7016	7255
4	524	1504	3834	5444	7100	8265	7470	7320
5	528	1546	3691	5580	7075	7188	6923	7018
6	506	1509	3518	5347	6790	7012	7063	7671
7	548	1604	3712	5525	7083	7363	7458	7210
8	592	1621	3742	5450	6962	7401	7215	7331
9	471	1473	3402	5271	6165	6902	6994	7224
10	496	1495	3511	5417	6995	7311	7532	7630
Średnia Average	523	1529	3585	5401	6844	7320	7215	7369

Jak widać, mniej więcej 18 dnia eksperymentu liczebność kultur wynosiła około 7300 osobników w 1 ml i wahała się na tym poziomie do 24 dnia, gdy doświadczenie przerwano z powodu technicznych trudności wysoce kłopotliwej hodowli w naczyniach przepływowych.

Wykres 3 podaje zbiorcze krzywe wzrostu liczebnego wszystkich czterech zastosowanych rodzajów kultur. Przebieg czterech krzywych wyraźnie potwierdza hipotezę dwóch podstawowych czynników przegęszczenia hodowli.

Na podstawie opisanych eksperymentów można zaproponować jednolitą koncepcję czynników niedogęszczenia i przegęszczenia kultury. Rola czynnika

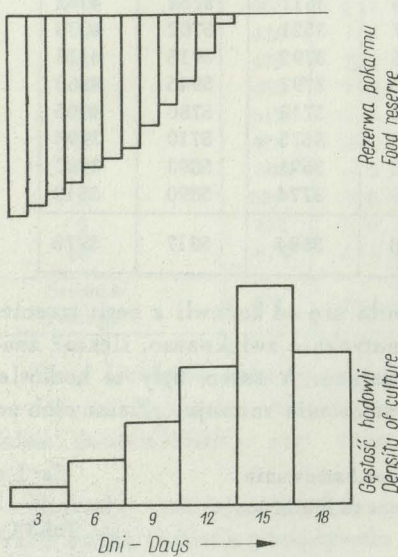


Fig. 2. Korelacja pomiędzy zmianami stężenia pożywki i zmianami liczebności kultury

Correlation between changes in nutrient density and changes in numbers of individuals in culture

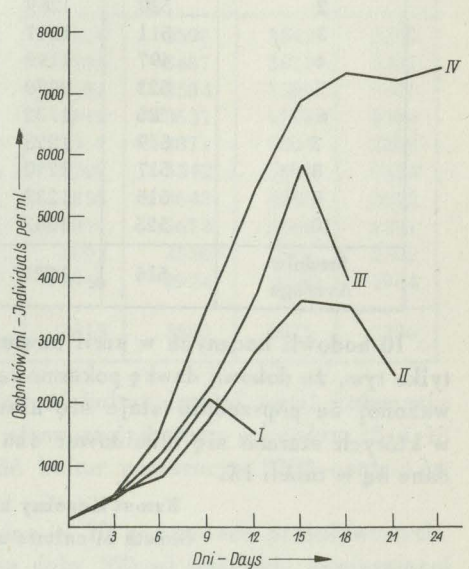


Fig. 3. Zmiany liczebności hodowli:

I - normalnych, II - hamowanych fizykochemicznie, III - hamowanych pokarmowo, IV - bez hamowania
Changes in numbers of individuals in cultures: I - normal, II - physicochemically inhibited, III - inhibited by food deficiency, IV - not inhibited

pokarmowego nie wymaga wyjaśnień, a rolę fizykochemicznych zmian środowiska należy powiązać z przekształceniami płynu hodowlanego na drodze tzw. biennych oddziaływań wymoczków na chemizm środowiska (Grębecki i Kuźnicki 1956). Przekształcenia te polegają przede wszystkim na zmianach pH i potencjału redox i są jednokierunkowe. Dlatego w okresie początkowym i w hodowlach nielicznych prowadzą one ku optimum warunków otoczenia. Wpływ ich jest wówczas stymulu-

jący, a niedogęszczenie osłabia go, jest więc niekorzystne. Zmiany fizykochemiczne płynu hodowli zachodzą jednak nadal, przekraczając optimum i stopniowo oddalając się od niego. Wpływ ich jest wówczas hamujący (choć brak samozatrucia sensu stricte), a przegęszczenie wzmaga go, jest więc również niekorzystne. Koncepcję tę potwierdzają dane uzyskane w badaniach nad odpornością, według których kultura stara zachowuje się podobnie, jak przegęszczona, a odświeżanie środowiska może często działać jak niedogęszczenie.

PIŚMIENICTWO

1. Allee, W. C. 1931 – Animal Aggregations – Chicago
2. Allee, W. C. 1934 – Recent studies in mass physiology – Biol. Rev. 9.
3. Allee, W. C. 1938 – The Social Life of Animals – New York.
4. Allee, W. C. 1941 – Integration of problems concerning protozoan populations with those of general biology – Biol. Symposia 4.
5. Buchanan, R. E., Fulmer, E. I. 1928 – Physiol. a. Biochem. Bacteria 1.
6. Chejfec, M. 1929 – Die Lebensdauer von *Paramecium caudatum* in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge – Acta Biol. Exp. 4.
7. Cutler, D. W., Crump, L. M. 1923 – The rate of reproduction in artificial cultures of *Colpidium colpoda* – Biochem. J. 17.
8. Cutler, D. W., Crump, L. M. 1925 – The influence of washing upon the reproduction rate of *Colpidium colpoda* – Biochem. J. 19.
9. Darby, H. H. 1930 – Studies on growth acceleration in *Protozoa* and yeast – J. Exp. Biol. Edinburgh 7.
10. Dimitrova, A. 1932 – Die fördernde Wirkung der Exkrete von *Paramecium caudatum* Ehrbg. auf dessen Teilungsgeschwindigkeit – Zool. Anz. 100.
11. Di Tomo, M. 1932 – Ricerche sul comportamento di *Paramecium caudatum* in un dato volume di cultura liquida – Boll. Zool. Napoli 3.
12. Greenleaf, W. E. 1924 – The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction of *Protozoa* – Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 21.
13. Greenleaf, W. E. 1926 – The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction of *Infusoria* – J. Exp. Zool. 46.
14. Grębecki, A., Kuźnicki, L. 1956 – Studia nad odpornością *Paramecium caudatum* wobec niektórych ekologicznie ważnych zmian chemizmu środowiska – Folia Biol. 4.
15. Hall, R. P. 1941 – Food Requirements and other Factors Influencing Growth of *Protozoa* in Pure Cultures – Calkins & Summers, *Protozoa in Biological Research* – New York.
16. Jahn, T. L. 1934 – Problems of the population growth in the *Protozoa* – Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 2
17. Johnson, W. H., Hardin, G. 1938 – Reproduction of *Paramecium* in old culture medium – Physiol. Zool. 11.
18. Loefer, J. B. 1936 – Bacteria-free culture of *Paramecium bursaria* and concentration of the medium as a factor in growth – J. Exp. Zool. 72.
19. Maupas, E. 1886 – Sur la puissance de multiplication des infusoires cillies – Arch. Zool. Exp. gen. 6.
20. Maupas, E. 1888 – Recherches experimentales sur la multiplication des infusoires cillies – C. R. Soc. Biol. Paris 103.

21. Meyers, E. C. 1927 — Relation of density of population and certain other factors to survival and reproduction in different biotypes of *Paramecium caudatum* — J. Exp. Zool. 49.
22. Petersen, W. A. 1929 — The relation of density of population to rate of reproduction in *Paramecium caudatum* — Physiol. Zool. 2.
23. Robertson, T. B. 1908 — On the normal rate of growth of an individual and its biochemical significance — Arch. Entw.-mech. 25.
24. Robertson, T. B. 1921 — Experimental studies on cellular multiplication — Biochem. J. 15.
25. Robertson, T. B. 1922 — Reproduction in cell-communities — J. Physiol. London 56.
26. Robertson, T. B. 1923 — The Chemical Basis of Growth and Senescence — Philadelphia-London.
27. Robertson, T. B. 1924a — The nature of the factors which determine the duration of the period of lag in cultures of infusoria — Austral. J. Exp. Biol. 1
28. Robertson, T. B. 1924b — The influence of washing upon the multiplication of isolated infusoria and upon allelocatalytic effect in cultures initially containing two infusoria — Austral. J. Exp. Biol. 1.
29. Robertson, T. B. 1924c — Allelocatalytic effect in cultures of *Colpidium* in hay infusions and in synthetic medium — Biochem. J. 18.

UNDER-DENSITY AND OBER-DENSITY STATES IN CULTURES OF *PARAMECIUM CAUDATUM*

Summary

Densification of a culture of *Paramecium caudatum* cannot be assigned an either entirely beneficial or entirely harmful role. It would seem that there is a certain optimum density of culture, to which either over-density or under-density may prove harmful, and therefore the various individuals in a culture may exert either a stimulating or inhibiting influence on each other. Such influence is not necessarily the consequence of an excess or deficiency of some specific substances or factors (the idea of autocatalysis and allelocatalysis), but is the result of the relation of each individual to its medium, which is at the same time the medium of all its partners. Thus the medium in this case proves to be the vehicle uniting the group of individuals in an integrate whole. Infusoria alter to a considerable degree the pH and redox potential in a medium (Grębecki and Kuźnicki 1956). These changes are one-way only, and therefore during the initial period and in sparse cultures, they usually lead to optimum medium conditions. Their influence is then stimulating, and under-density is harmful, since it weakens it. Physico-chemical changes continue, however, to take place in the culture medium, passing on from the optimum and gradually moving further away from it. Their influence then become inhibiting, and over-density injurious, since it intensifies this influence. In addition to the physico-chemical changes in the medium, a significant part is played by food relations, which must be regarded as a second fundamental factor of over-density.

The theory of two fundamental factors of over-density can be checked in practice. Comparison was made of the growth of cultures subject simultaneously to inhibition by food deficiency and by physico-chemical agents, cultures inhibited physico-chemically only, cultures inhibited by food factor only, and those in which endeavour was made to remove both kinds of inhibition. Successive removal of densification factors intensified the maximum density of culture attainable.