

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii fakulty všeobecného lékařství KU, Praha

L-FORMY CORYNEBACTERIUM PYOGENES HOMINIS

F. PATOČKA, D. KALVODOVÁ

K 60. narozeninám prof. dr. K. Rašky, DrSc.

Důležitost L-forem pro studium fyziologie baktérií, popř. jejich morfologie a zejména bakteriálních povrchů, je v novější době právem zdůrazňována, i když po pionýrských pracích Klienebergerové-Nobelové a Dienesových dočasně upadl zájem o tyto formy bakteriálního života podobné mykoplazmatům. Jsou s velkou intenzitou studovány také již proto, že není zcela jasné jejich množení a že jsou analogické sféroplastům, event. protoplastům baktérií, až na to, že pravidelně vytvářejí kolonie, které jsou sériově přeočkovatelné. Někdy, i když vzácně, mají i metabolické rysy odlišné od bakteria, z něhož vznikají (1). Nestabilní formy (tzv. B-typ), analogické spíše sféroplastům, jsou někdy považovány za extrémní varianty vzniklé vlivem prostředí, které nedovoluje syntézu úplně buněčné stěny. Jiní se snaží dokázat, že tzv. stabilní, tj. reverze neschopné L-formy (typ A), jsou spíše mutantami.

Nedořešenou zůstává fundamentální otázka, jakou roli hrají L-formy patogenních baktérií v patogenezi některých chorob, zejména chronických a recidujících. Není vyloučeno, že L-formy, nezasažitelné některými antibiotiky, zejména penicilinem, i protilátkami, které jsou namířeny zhusta proti komponentám bakteriálních povrchů, zejména stěn, mohou se vytvářet a přežívat dlouhodobě ve zvířecím či lidském organismu, snad i po dlouhou dobu a po náhodné reverzi v původní bakterium vést k akutnímu vzniku (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Patogenita samotných L-forem se hodnotí různě. Tam, kde jsou patogenní schopnosti bakteria, popř. faktory virulence umístěny na povrchu, ukazují se v experimentu na zvířeti nepatogenní (viz L-formy streptokoků). Naproti tomu L-formy některých bacilů (*Clostridium tetani*) syntetizují toxin uvnitř buňky a produkují do média, podobně jako *C. tetani* samo (8).

Naším úkolem bylo pokusit se o dosažení L-forem z bakteria, které je jedním z hlavních předmětů našeho studia v posledních letech, tj. *Corynebacterium pyogenes hominis* (9, 10, 11, 12, 13), které je identické s *Corynebacterium haemolyticum* (14, 15).

MATERIÁL A METODY

Použité kmeny:

K pokusu o indukci L-forem byly použity kmeny *Corynebacterium pyogenes hominis* K-501, 31, 32, 33 a 34, které produkovaly hemolyzin a dermonekrotoxin identifikovaný jako fosfolipáza D (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26).

Půda pro izolaci a sériovou kultivaci L-forem

Byl používán Brain-Heart-Infusion Agar (dále BHIA) s 1000 j. penicilinu/ml, 2% NaCl (27), 0,5 % kvasničného extraktu a 10 % koněškého séra, popsaný Havlíčkem (28). Tato půda je dále označována ALM (agarové L-médium). Podstatné zlepšení tvorby a vývoje L-forem bylo pozorováno po přidání acetheminu v množství 3 mcg/ml této půdy. Vzhledem k tomu, že řada získaných L-forem po několika pasážích hynula, byl do půdy přidáván 0,2% MgSO₄ pro stabilizaci (29).

Získání L-forem

Byla zkoušena klasická metoda penicilinového gradientu (30, 31, 32), ta se však vždy neosvědčila. Nejlépe se dařila izolace L-forem přímým naočkováním shora popsané půdy bujónovou primokulturou z lyofilizovaných kmenů pyogenních korynebakterií. Plotny byly inkubovány zalepené (pro udržení vlhkosti) při 35—36 °C a denně prohlíženy zvětšením mikroskopu 60krát.

Pasáže L-forem

Čerstvé agarové půdy stejného složení byly očkovány bločkem s vyvinutými L-koloniemi. Kultury byly pasážovány po 7—10 dnech (vzhledem k jejich relativně pomalému růstu). Růst v tekutých půdách se dosud nezdařil.

Prověřování stability L-forem:

Schopnost reverze v původní bakteriální formu byla zjištována jednak sériovými pasážemi na ALM bez penicilinu, jednak na izotonickém BHIA s 0,5 % kvasničného extraktu a 10 % beraní krve. V tekuté půdě (ALM bez agaru a bez penicilinu) byla reverze zkoušena kultivací vloženého bločku s L-koloniemi.

VÝSLEDKY

L-formy se podařilo indukovat z kmenů *Cor. pyogenes hominis* K-501, 32 a 31 (tentotého kmen po několika pasážích uhynul). L. kolonie se vyvíjely v primokultuře do 7 dnů, u pasážovaných kultur za 4—5 dnů. Kultury L-forem si uchovávaly životnost krátce, obvykle jen do 14 dnů.

Morfologie kolonií: Kolonie měly vzhled typický pro L-formy (obr. 1), s hutným granulovaným centrem a charakteristicky jemnější, zčásti pěnovitou periférií. Rozměry centra vzhledem k periférii kolísaly, někdy v souvislosti se stářím kultury, někdy podle výchozího kmene. Izolované kolonie dosahovaly průměru až 0,5 mm. V otiskovém barveném preparátu (provedeno laskavostí dr. Suchanové) nebylo patrně rozdílu mezi L-formami námi získanými a L-formami z jiných bakterií.

Faktory ovlivňující růst: Naše několikaleté zkušenosti ukázaly, že přidání acetheminu příznivě ovlivňuje růst a formaci L-kolonií, porovnáno s půdami stejného složení, ale bez heminu. Z různých zkoušených sér (koňské, telecí a králičí) se nám nejlépe osvědčilo čerstvé koňské sérum v množství 10 %. Přítomnost séra, stejně tak jako zvýšený osmotický tlak (2% NaCl), byly nezbytnými podmínkami kultivace L-forem.

Reverze L-forem: U všech izolovaných kmenů L-forem byla opakována prověřování schopnost reverze v bakteriální formu na půdách bez penicilinu. Nejvhodnější k tomuto účelu byla uvedená BHIA půda s krví. U všech kmenů byla prokázána schopnost reverze ve výchozí formu bakteriální, a to i po desítkách pasáží L-forem. Reverze nastávala pouze u části populace, a to většinou po opakování kultivace bez penicilinu. U nově izolovaných L-forem a po malém počtu pasáží nastávala reverze někdy už při prvé kultivaci, kdy bylo možno pozorovat postupnou přeměnu vyvíjející se L-kolonie v kolonii bakteriální (obr. 2).

Ve snaze dosáhnout nerevertujících kultur bylo zvyšováno kvantum penicilinu v půdě, a to na 2000 j. a později na 5000 j./ml. Ukázalo se, že kultury rostoucí na 2000 j. penicilinu revertovaly méně snadno (až po trojnásobné pasáži na půdách bez penicilinu). Kultury pěstované na půdách s 5000 j. penicilinu zpočátku sice rostly a byly typického vzhledu, a pokud bylo možno prokázat, k reverzi u nich nedocházelo. Avšak při dalších pasážích na půdách s 5000 j. penicilinu degenerovaly, takže nebylo možno je udržet trvale.

Jako další úkol bylo postulováno zjistit, zda L-formy námi získané jsou schopny produkovat některé exoproduky, charakteristické pro bakteriální formy *Corynebacterium pyogenes* h., a to zejména hemolyzin a dermonekrotoxin (fosfolipázu D), tak jak tyto látky byly prokázány pro bakterium ve shora citovaných pracích.

Produkce hemolyzinu L-formami byla prokázána tímto pokusem: dobře vyrostlá kultura L-kolonií byla převrstvena ALM se 4 % beraných krvinek. Po 24 hod. inkubaci při 35 °C vznikla kolem kolonií zřetelná zóna beta-hemolýzy (obr. 3), která svědčí o tom, že typický hemolyzin je L-formami tvořen.

Průkaz toxinu (fosfolipázy D) *in vivo*: Bločky agaru s hustě narostlou 6—8denní kulturou L-formy byly mechanicky rozdrceny, dezintegrovány trojnásobným rychlým mrazením a táním, centrifugovány a supernatant byl filtrován membránovým filtrem (velikost pórů 150 m μ). Sériová ředění filtrátu byla

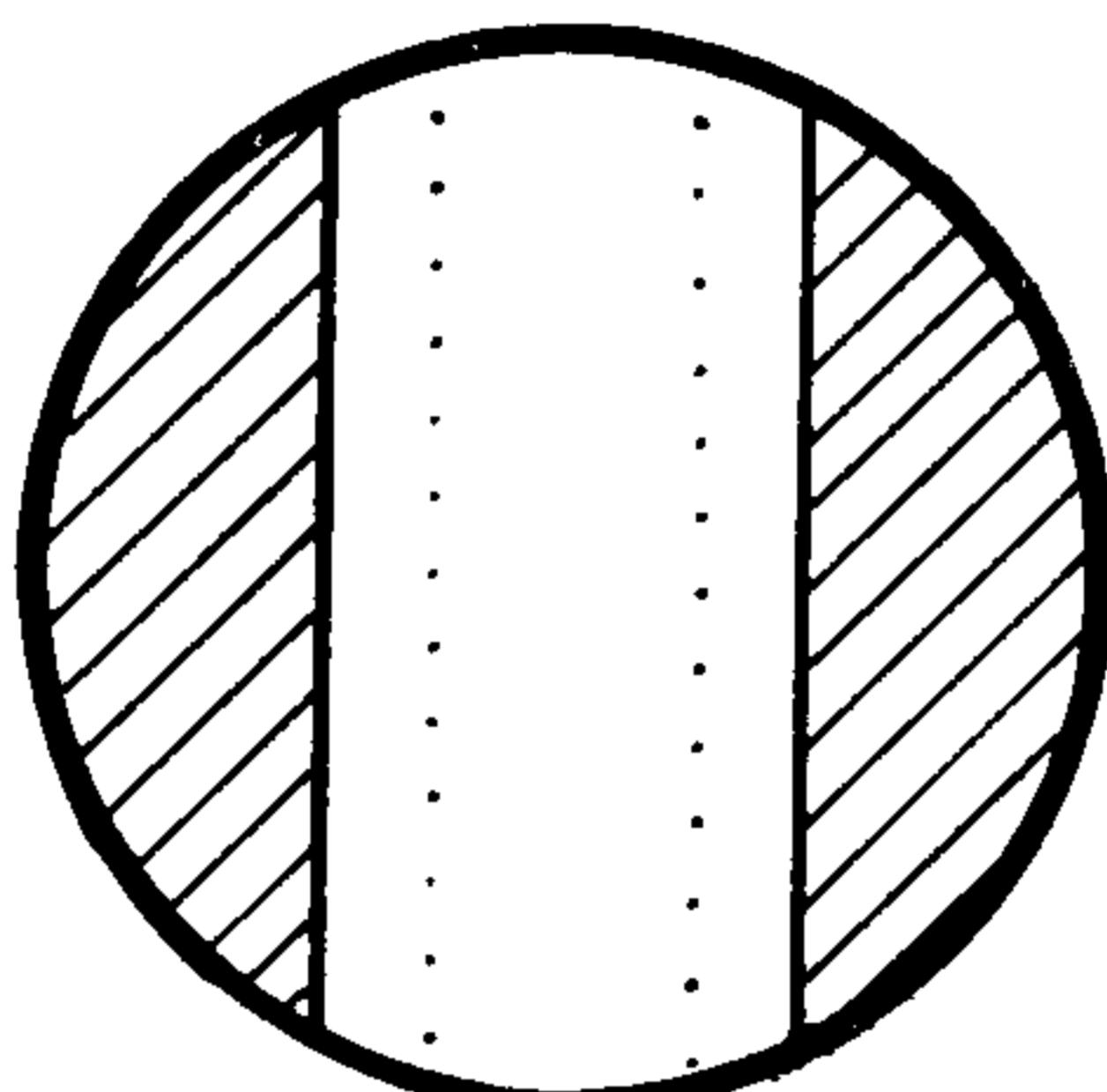


Schéma 1. Inokulace úsečí půdy L-formou (šrafované části značí primární kulturu L-formy, tečkováním znázorněno pole sekundární kultivace)

vstřikována i. d. králíku. Za 3—5 hod. vznikla reakce, typická pro toxin pyogenního korynebakteria (zřetelný zánětlivý edém s centrální nekrózou, obklopenou v nejvyšších koncentracích hemorrágickým lemem). Vzhledem k tomu, že bylo použito filtrátu s přidáním penicilinu, a že nástup reakce byl rychlý, je zřejmé, že šlo o toxin produkovaný L-formou a difundující do agaru.

Že jde o typickou reakci vyvolanou fosfolipázou, ukázal nejen charakter lézí, ale i to, že aktivita toxinu L-form byla neutralizována specifickým antitoxinem (poskytl laskavě dr. Souček).

Průkaz toxinu in vitro: Posunováním bločku s kulturou L-formy po povrchu izotonického krevního agaru bez penicilinu vznikla lineární stopa, na niž kolmo byl očkován pyogenní stafylokok, produkovající alfa- i beta-lyzin. Po inkubaci vznikla inhibice stafylokokové hemolýzy, tzv. inverzní CAMP test (obr. 4), popsaný pro *Corynebacterium pyogenes hominis* (33). Z agarového bločku byl zřejmě uvolněn toxin jednak v něm obsažený, jednak pocházející nesporně z rozrcených povrchových částí L-kolonií. Na obrázku je patrná i lehká hemolýza, způsobená hemolyzinem uvolněným do bločku.

Inhibice růstu L-formem homologními L-formami: ALM půdy byly naočkovány v kraiových úsecích, jak je znázorněno na schématu 1, L-formou pyogenního korynebakteria. Kultury byly inkubovány 3, 5, 7 a více dní (I. fáze) a poté byl sterilní střed půdy očkován čerstvou kulturou téže L-formy (II. fáze). Jako kontrola byla očkována půda bez úsečí, avšak inkubovaná za stejných podmínek. Výsledky jsou patrný na obrázcích 5 a 6. Na kontrolních půdách rostly normální L-kolonie (obr. 1). Na půdách, vystavených vlivu předchozí kultury L-form, se ukázaly degenerativní změny v kultuře II. fáze. Intenzita těchto změn byla úměrná délce předchozí kultivace. Po 3 dnech působení předkultury

byly L-kolonie degenerované, defektní v centru i okrajích, a zakrnělé (obr. 5). Po 5, 7 a více dnech působení se vyvinuly buď zcela rudimentární kolonie, nebo se vznikající kolonie rozpouštěly (obr. 6).

Tento fenomén byl pozorován rovněž tehdy, byly-li v I. fázi očkovány úseče bakteriální formou (na ALM bez penicilinu). V obou případech byl agar ze sterilního centra opakovaně prověřován na obsah toxinu. Toxin difundoval ve stoupajícím kvantu do centrální zóny.

Na základě tohoto nepřímého důkazu jsme přesvědčeni, že nikoli banální metabolické produkty L-forem, nýbrž právě toxicá fosfolipáza je příčinou degenerace až lýzy L-forem homologního typu. Toto je tím spíše pochopitelné, že, jak se ukázalo (34, 35), některé L-formy, např. pyogenního streptokoka, mají ve své povrchové membráně více než dvojnásobné množství lipidů různého typu (především glykolipidů a fosfolipidů) než membrány protoplastů příslušných streptokoků. Konečný důkaz této skutečnosti, že totiž fosfolipáza D, produkována *Corynebact. pyogenes hominis* a jeho L-formou, má inhibiční až lytický vliv na růst jiných L-forem a mykoplasmat, pokusíme se podat v dalším sdělení.

DISKUSE

Nálezy v práci prezentované ukazují několik nových faktů a otvírají nové problémy. Především jsme prokázali schopnost tvorby L-forem u pyogenního korynebakteria, které dosud, pokud je nám známo, nebyly popsány. Za důležité považujeme zjištění, které bylo dosud rovněž ověřeno jen v několika málo případech, že L-forma *Cor. pyogenes hominis* je schopna produkovat toxin typický pro výchozí bakterium (fosfolipázu D, účinkující na sfingomyelin) a prokazatelná kvanta hemolyzinu. Produkce obou těchto látek je podstatně slabší než u bakteriální formy, což je pochopitelné při masivnosti růstu a mohutnějším metabolismu bakteria, porovnaných s L-formou. Zdá se však, že kvalitativně, alespoň co se těchto dvou produktů týče, není mezi L-formou a výchozím bakteriem podstatný rozdíl.

Prozatím nevysvětlená zůstává otázka faktoru, podporujícího růst, který byl námi zjištěn a standardně používán, tj. heminu. Je-li tato látka esenciálním faktorem pouze pro L-formy, nebo ovlivňuje-li také růst výchozího bakteria, jsme prozatím nejistili, i když některé orientační pokusy by se zdály tomu na svědčovat. Problematiku lýzy L-forem metabolickými produkty též L-formy, difundujícími do půdy, necháváme prozatím nedořešenou, i když jsme téměř přesvědčeni, že je to především fosfolipáza D, která tento degenerativní až lytický vliv vykonává. Zcela jasný důkaz by musel být proveden za použití antitoxicitého séra proti fosfolipáze D. Při běžném uspořádání pokusu to dosud nebylo možné, neboť antitoxin obsahoval asi také stopy protilátek dalších, patrně proti některým frakcím protoplazmatické membrány bakteria, takže sám částečně inhiboval růst L-forem.

Stejně tak otevřeným problémem zůstává získání čisté kultury L-forem absolutně nerevertujících. Poměrně snadná schopnost reverze většiny L-forem (ač bylo použito všech běžných metodik) může mít řadu příčin. Jednou z nich je pravděpodobně vysoký obsah lipidů (prozatím blíže neurčeny) v buněčných stěnách bakteria a snad i produkce fosfolipázy samotné, o které není vyloučeno, že hraje určitou roli v lipidickém metabolismu jak mikroba, tak L-formy.

SOUHRN

Z kmenů *Corynebacterium pyogenes hominis* (*Cor. haemolyticum*) K-501, 31 a 32 byly izolovány L-formy na půdách a penicilinem a 2% NaCl. Morfologicky se nelišily od L-forem jiných bakterií. Byly sériově pasážovány na půdách

s penicilinem, po větším počtu pasáží však často podléhaly degeneraci. L-formy byly osmoticky labilní. Faktorem podporujícím růst L-forem se ukázal být hemin. Lépe než metoda penicilinového gradientu se při indukci L-forem osvědčila izolace primokultur lyofilizovaných kmenů na půdě s 1000 j. penicilinu. I po mnoha pasážích byla většina L-kolonií nestabilních, tj. po opakování kultivaci bez penicilinu revertovala ve výchozí bakterium. Pěstování L-forem v tekuté půdě se zatím nepodařilo.

Dále bylo prokázáno, že L-formy pěstované na penicilinových půdách (tedy spolehlivě nerevertované) produkují hemolyzin a zejména dermonekrotoxin (fosfolipázu D), typické pro výchozí bakterium. Charakteristické vlastnosti fosfolipázy D, produkované L-formami, byly prokázány jak experimentem in vivo, tak i zvlášt modifikovaným pokusem in vitro. Účinek fosfolipázy D L-forem byl neutralizován antitoxinem proti fosfolipáze výchozího bakteria. Metabolické produkty L-forem (pravděpodobně toxin sám) vyvolávaly při určitém uspořádání pokusu degeneraci až lýzu homologních L-forem.

ВЫВОДЫ

L-формы *Corynebacterium pyogenes hominis*

Патоčка Ф., Кальводова Д.

Из штаммов *Corynebacterium pyogenes hominis* (*Cor. haemolyticum*) K-501, 31 и 32 были выделены L-формы на средах с пенициллином и 2% хлористого натрия. В морфологическом отношении они не отличались от L-форм других бактерий. Они серийно перевивались на средах с пенициллином, однако после большого числа пассажей они часто подвергались дегенерации. L-формы были осмотически лабильными. Фактором, содействующим росту L-форм, оказался гемин. Лучше, чем метод пенициллинового градиента, при индукции L-форм оправдало себя выделение первичных культур лиофилизованных штаммов на среде с 1000 ЕД пенициллина. Даже после многих пассажей большинство колоний L было нестабильных, т. е. после повторного культивирования без пенициллина они превращались в исходную бактерию. Выращивание L-форм в жидкой среде до сих пор не удалось произвести.

Далее было доказано, что L-формы, выращиваемые на пенициллиновых средах (следовательно надежно необратимые), выделяют гемолизин и главным образом дермонекротоксин (фосфолипазу D), типичные для исходных бактерий. Характеристические свойства фосфолипазы D, выделяемой L-формами, были доказаны как экспериментом in vivo, так и в особенности модифицированным опытом in vitro. Действие фосфолипазы D L-форм было нейтрализовано антитоксином против фосфолипазы исходных бактерий. Метabolické produkty L-forem (po všech verotnosti, sam toxin) вызывали pri opredelennej postanovke opytu degeneraciu i daje lysis homologich L-forem.

Čs. Epidem., 18, 1969, 5—6 : 284—289.

SUMMARY

L-forms of *Corynebacterium pyogenes hominis*

Patočka F., Kalvodová D.

L-forms were isolated from *Corynebacterium pyogenes hominis* (*C. haemolyticum*), strains K-501, 31 and 32, using media with penicillin and 2% NaCl. They did not differ in their morphology from L-forms of other bacteria. Serial

passages were made on media with penicillin, however, they frequently degenerated after a greater number of transfers. The L-forms were osmotically labile. Hemin proved to be a growth supporting factor. In the induction of L-forms isolation of primary cultures of lyophilized strains on media with 1000 units of penicillin proved superior to the penicillin gradient method. Even after many passages most of the L-colonies were not stable, *i. e.* after repeated cultivation on media without penicillin they reverted to their original bacterial forms. Cultivation of L-forms in liquid media was unsuccessful so far.

Further, it was demonstrated that L-forms cultivated on penicillin media (*i. e.* reliably nonreverted forms) produce hemolysin and especially dermonecrotoxin (phospholipase D) which are characteristic of the original bacterium. The characteristic properties of phospholipase D produced by L-forms were demonstrated *in vivo* and in a specially modified experiment *in vitro*. The activity of phospholipase D of the L-forms was neutralized by antitoxin against phospholipase of the original bacterium. Metabolites of L-forms (probably the toxin itself) under certain experimental conditions induced degeneration and lysis of homologous L-forms.

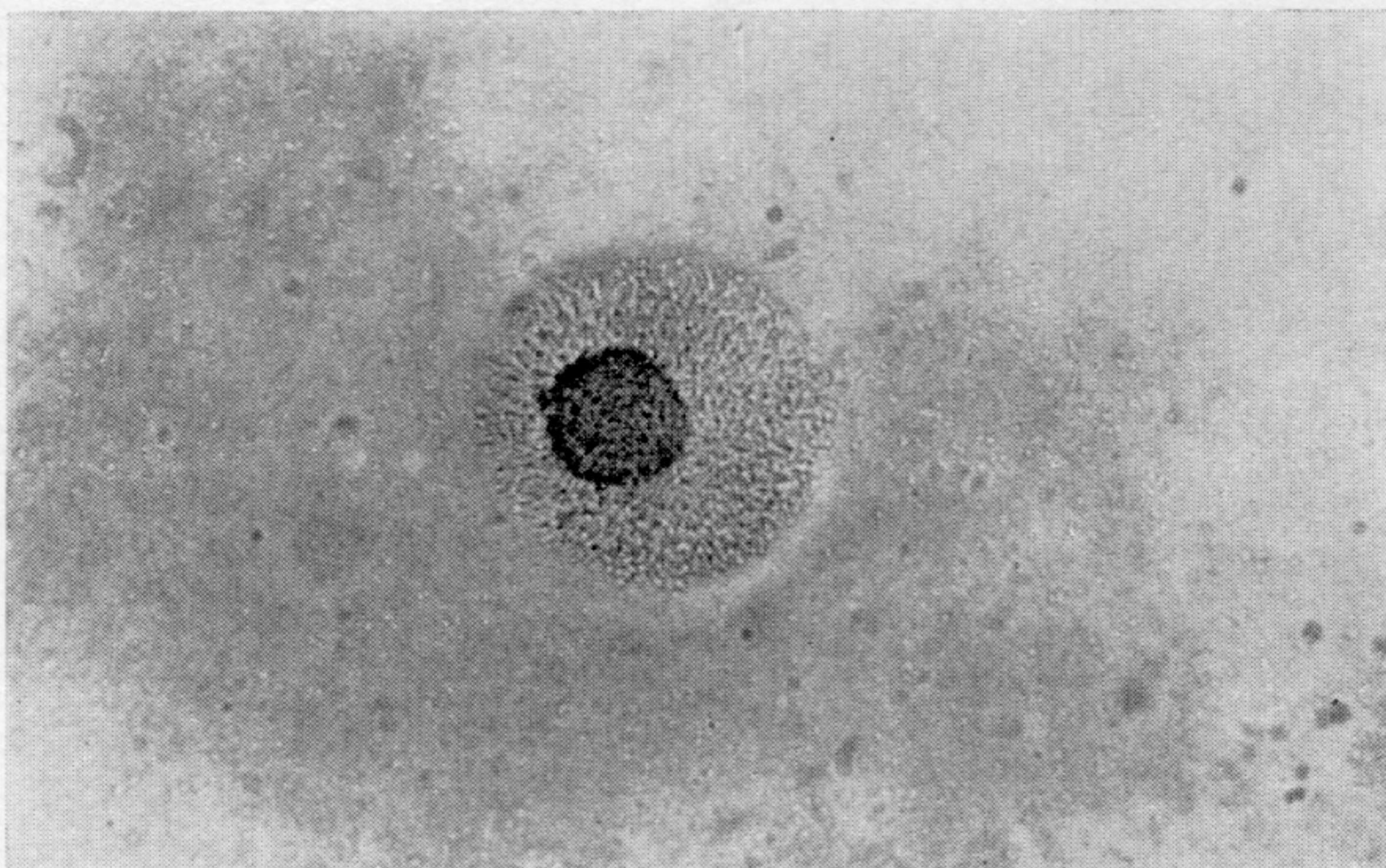
Čs. Epidem., 18, 1969, 5—6 : 284—289.

LITERATURA

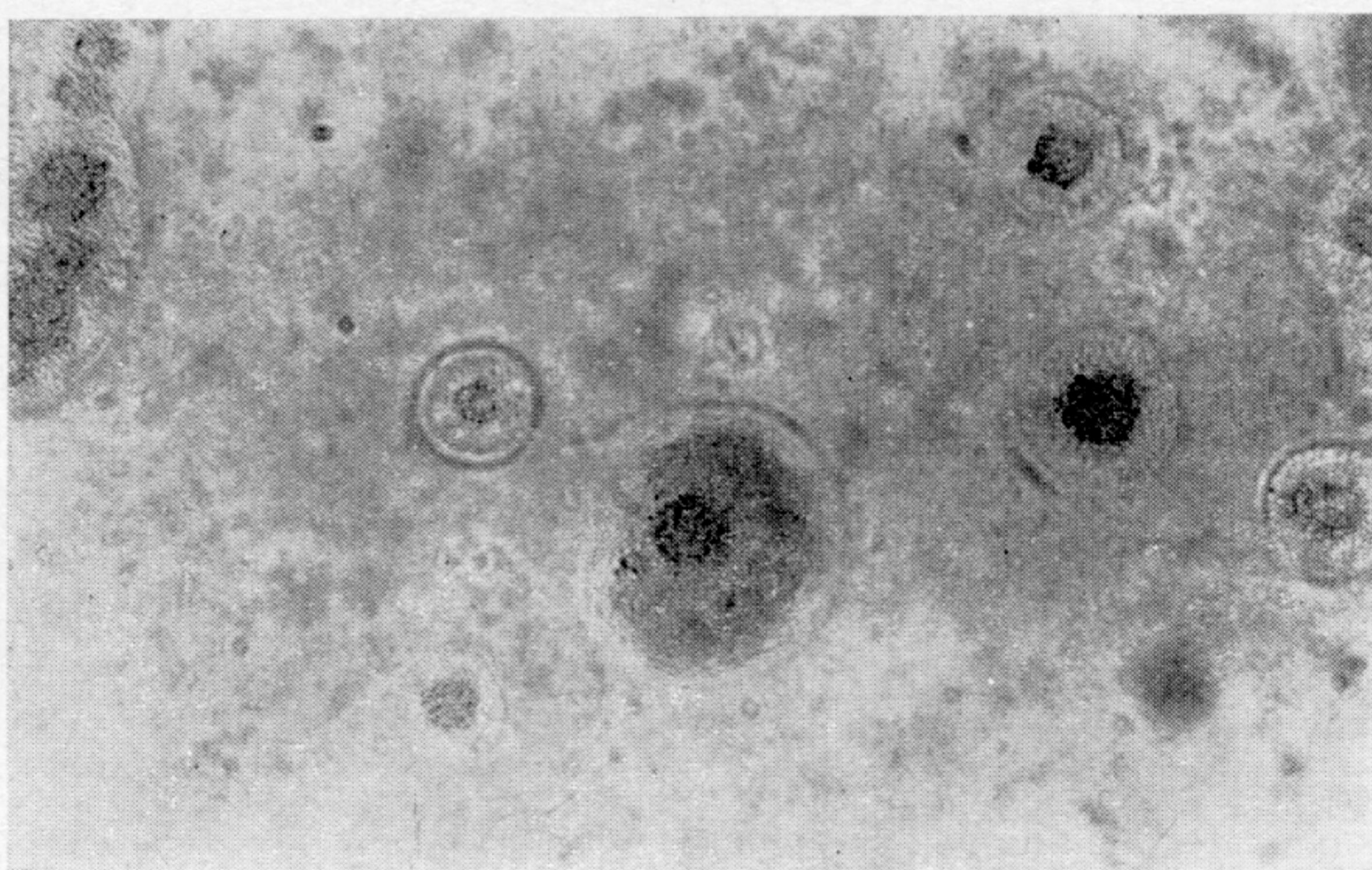
1. Smith, J. A., Willis, A. T.: J. Path. Bact., 94, 1967 : 359. — 2. Mattman, L. H., Mattman, P. E.: Arch. intern. Med., 115, 1965 : 315. — 3. Mattman, M. S., Mattman, L. H., Mattman, P. E.: Amer. J. clin. Path., 51, 1969 : 41. — 4. Godzeski, C., Brier, G., Glenn, W.: Life Sci., 7, 1968 : 107. — 5. Hamburger, M.: Arch. intern. Med., 122, 1968 : 175. — 6. Rosner, R.: Amer. J. clin. Path., 50, 1968 : 385. — 7. Conner, J. F., Coleman, S. E., Davis, J. L., McGaughey, F. S.: J. Amer. Geriat. Soc., 16, 1968 : 893. — 8. Rubio-Huertos, M., Gonzales-Vazquez, C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 79, 1959 : 626. — 9. Patočka, F.: Čas. Lék. čes., 94, 1955. — 10. Patočka, F., Mára, M., Souček, A., Jedličková, A., Záhorová, L.: Čs. Epidem., 1961. — 11. Patočka, F., Souček, A., Mára, M.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 4, 1960 : 307. — 12. Patočka, F., Mára, M., Souček, A., Součková, A.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 6, 1962 : 1. — 13. Souček, A., Součková, A., Mára, M., Patočka, F.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 6, 1962 : 13. — 14. McLean, P. D., Liebow, A. A., Rosenberg, A. A.: J. infect. Dis., 79, 1964 : 69. — 15. Patočka, F.: Proc. of the XIth Conf. of Charles Univ. Med. Fac., 1966 : 58. — 16. Patočka, F., Souček, A., Součková, A.: Spisy Přírodověd. fak. Univ. J. Ev. Purkyně v Brně, 10, 1964 : K32—522. — 17. Souček, A., Součková, A.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 8, 1964 : 190. — 18. Souček, A., Součková, A.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 8, 1964 : 199. — 19. Souček, A., Součková, A., Mára, M.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 8, 1964 : 132. — 20. Souček, A., Součková, A.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 10, 1966 : 125. — 21. Souček, A., Součková, A., Mára, M., Patočka, F.: IXth Intern. Congr. for Microbiol., Abstracts, 1966 : 609. — 22. Mára, M., Patočka, F., Souček, A.: Plzeňský lék. Sborn., Suppl., 16, 1966 : 105. — 23. Souček, A., Součková, A., Patočka, F.: J. Hyg. Epidem. (Praha), 11, 1967 : 123. — 24. Souček, A., Součková, A.: Proc. XIth Conf. Charles Univ. Med. Fac., 1966 : 70. — 25. Součková, A., Souček, A.: Proc. XIth Conf. Charles Univ. Med. Fac., 1966 : 85. — 26. Mára, M.: Proc. XIth Conf. Charles Univ. Med. Fac., 1966 : 93. — 27. Dienes, L., Sharp, J.: J. Bact., 71, 1956 : 208. — 28. Havlíček, J.: Čs. Epidem., 15, 1966 : 203. — 29. Edman, D. C., Pollock, M. B., Hall, E. R.: J. Bact., 96, 1968 : 352. — 30. Sharp, J. T.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 87, 1954 : 94. — 31. Suchanová, M., Patočka, F.: Čs. Epidem., 7, 1957 : 133. — 32. Rotta, J., Karakawa, Krause: J. Bact., 89, 1965 : 158. — 33. Záhorová, L., Kubelka, V.: Folia microbiol. (Praha), 5, 1960 : 57. — 34. Panos, C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 143, 1967 : 152. — 35. Ward, I. B., Perkins, H. R.: Biochem. J., 106, 1968 : 391.

F. Patočka, D. Kalvodová

L-FORMY CORYNEBACTERIUM PYOGENES HÓMINIS



Obr. 1

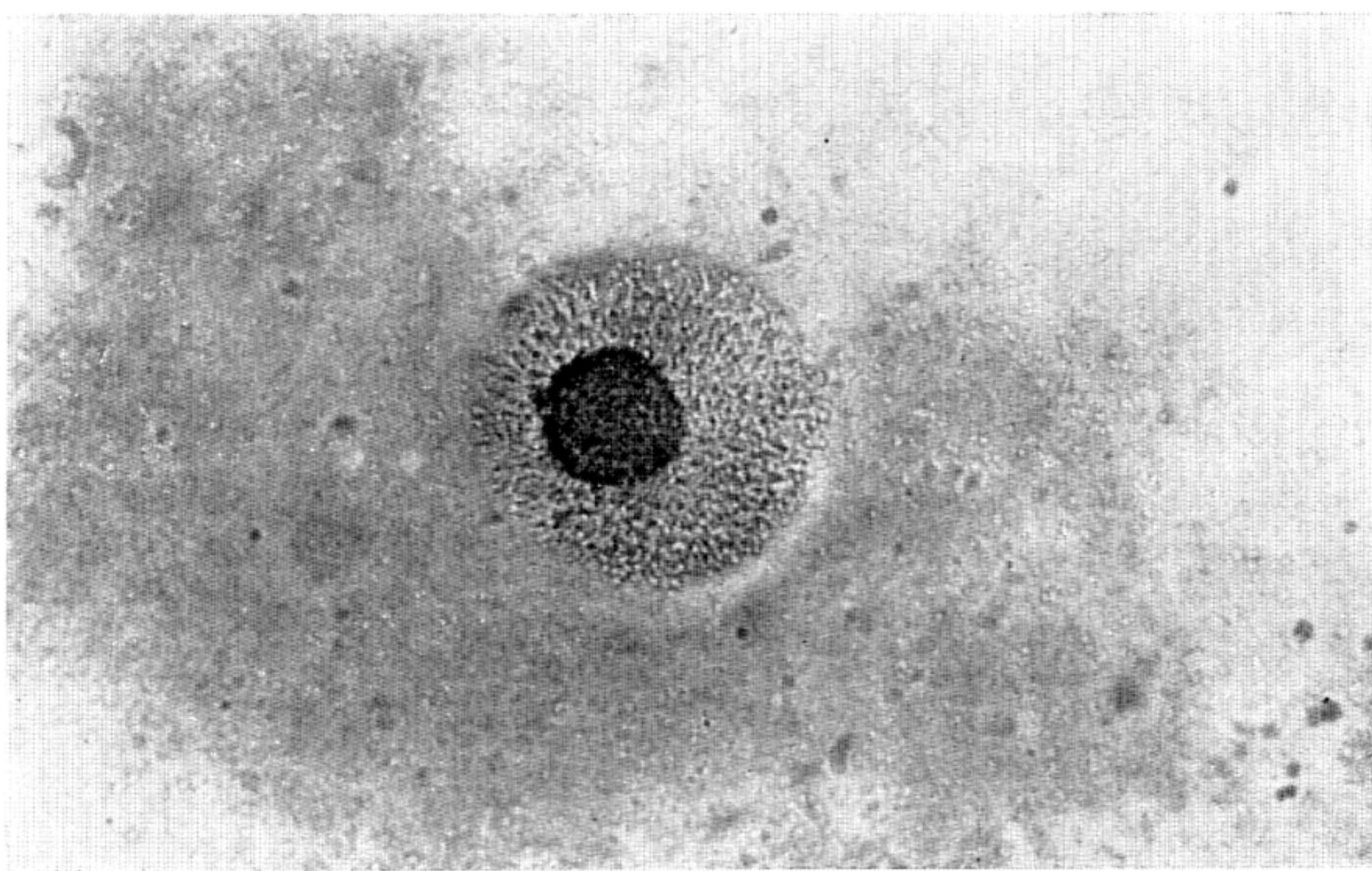


Obr. 2

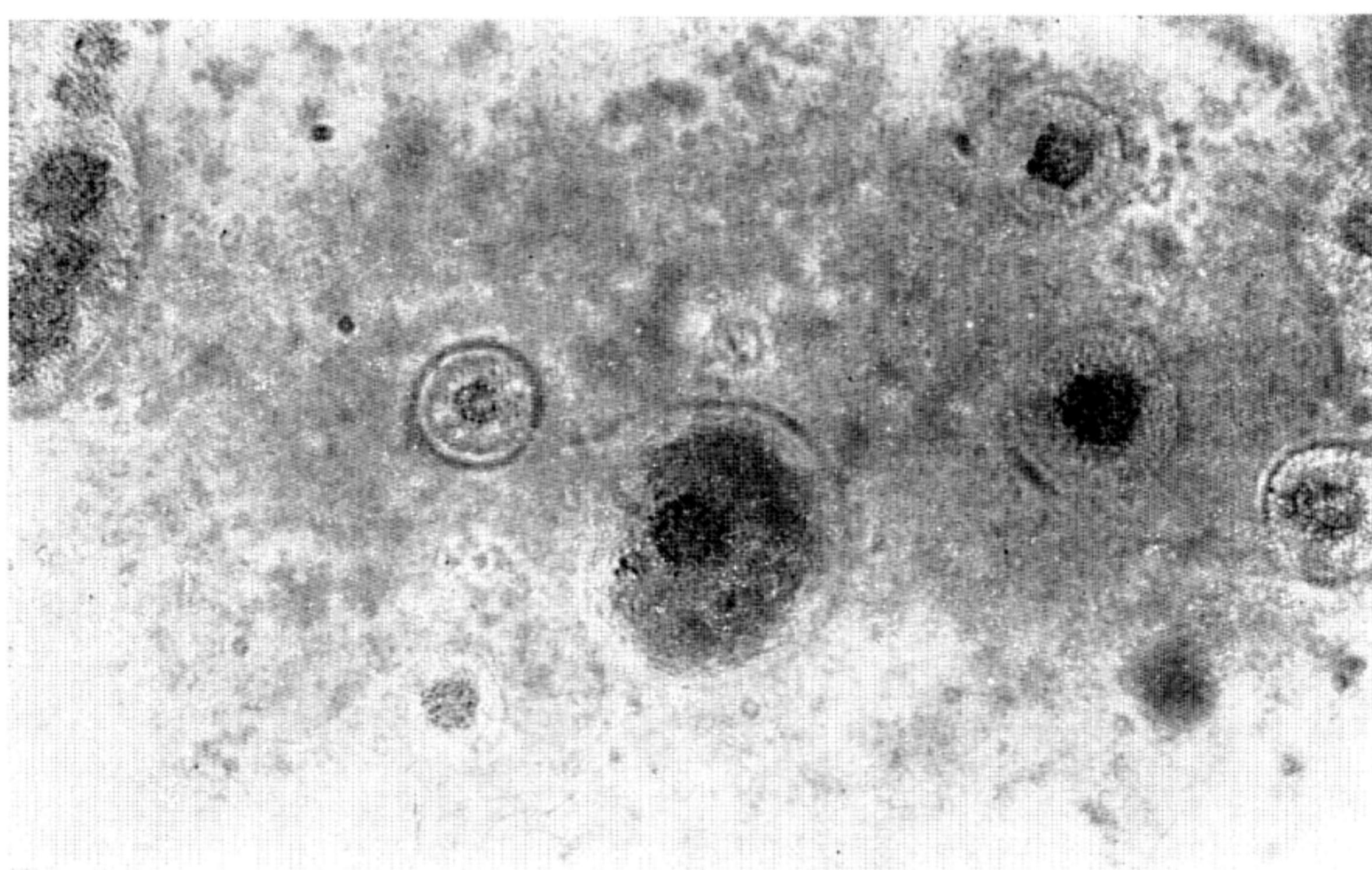
Obr. 1. Kolonie L-formy *Corynebacterium pyogenes hominis*, kultivace 5 dní. Nativní preparát, zvětšeno 100krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 2. L-kolonie na půdě bez penicilinu, uprostřed kolonie revertující v bakteriální formu. Nativní preparát, zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 3. Průkaz hemolyzinu L-formy. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 4. Detekce fosfolipázy D, produkované L-formou, *in vitro* (inverzním CAMP testem). Velikost $\frac{3}{4}$. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 5. Degenerativní změny L-kolonií po předchozím 3denním působení homologní kultury. Nativní preparát, zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 6. Pokročilá degenerace též kultury až lýza tvořících se kolonií po 7denním působení. Zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle

F. Patočka, D. Kalvodová

L-FORMY CORYNEBACTERIUM PYOGENES HOMINIS

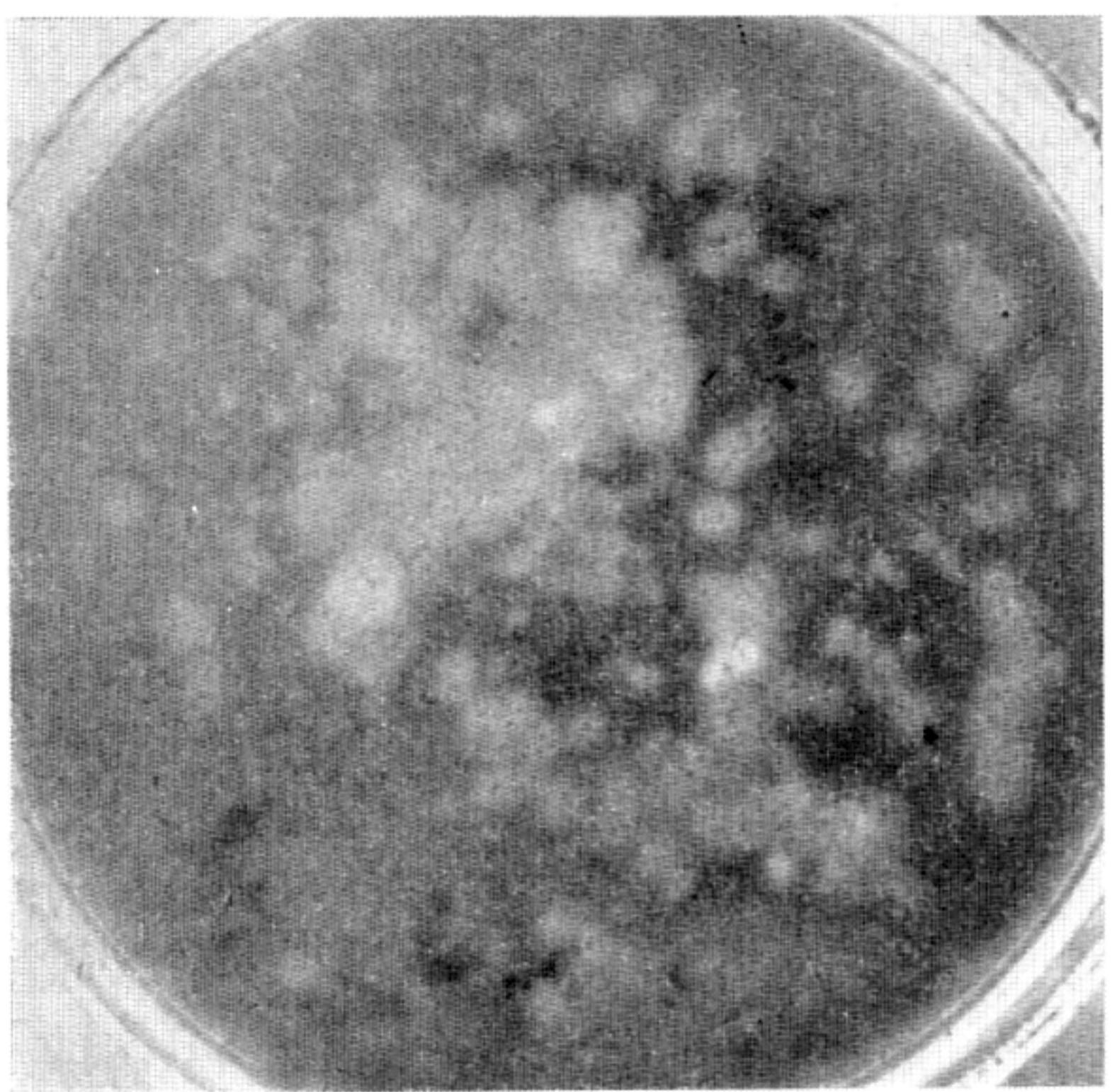


Obr. 1

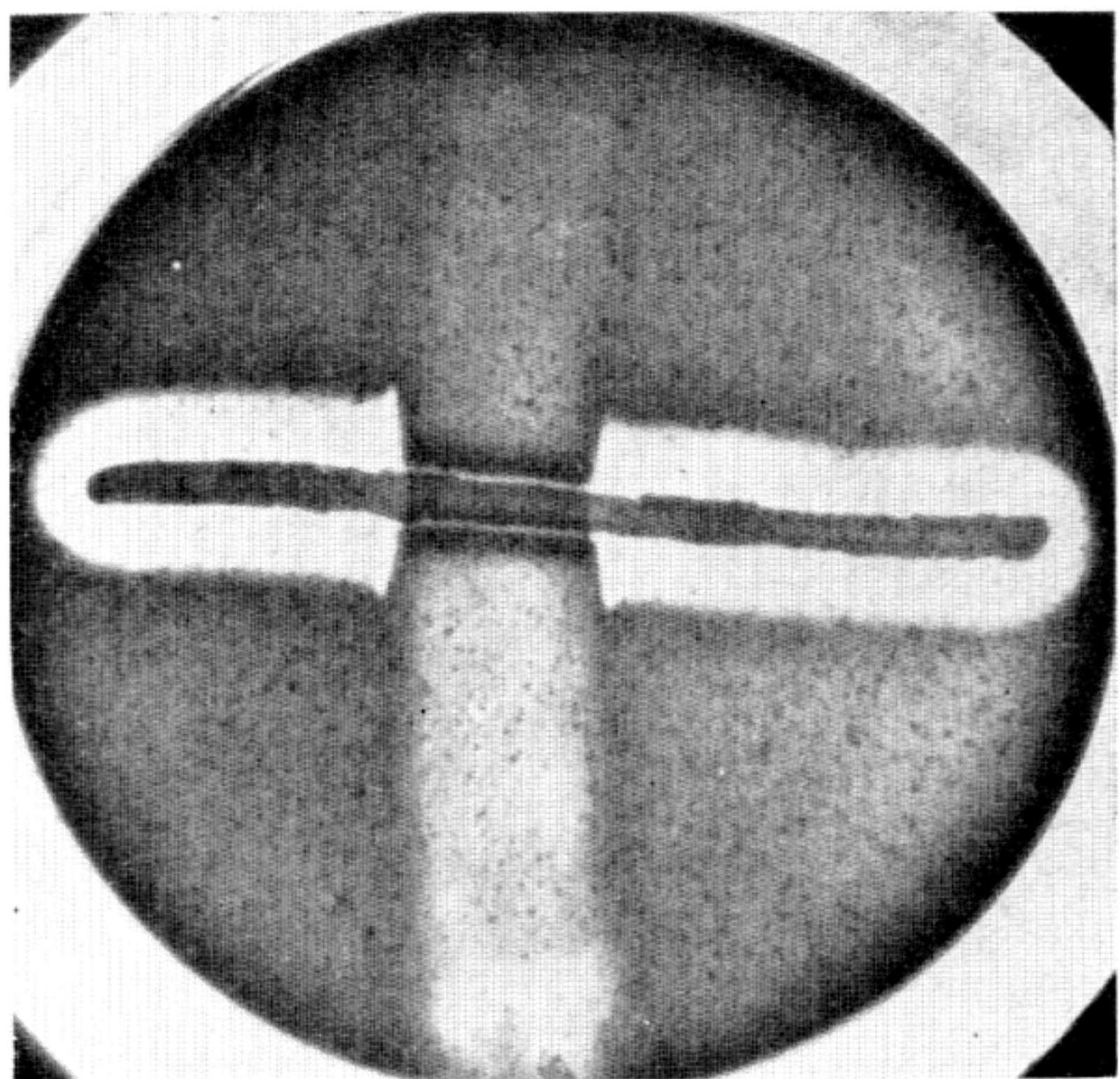


Obr. 2

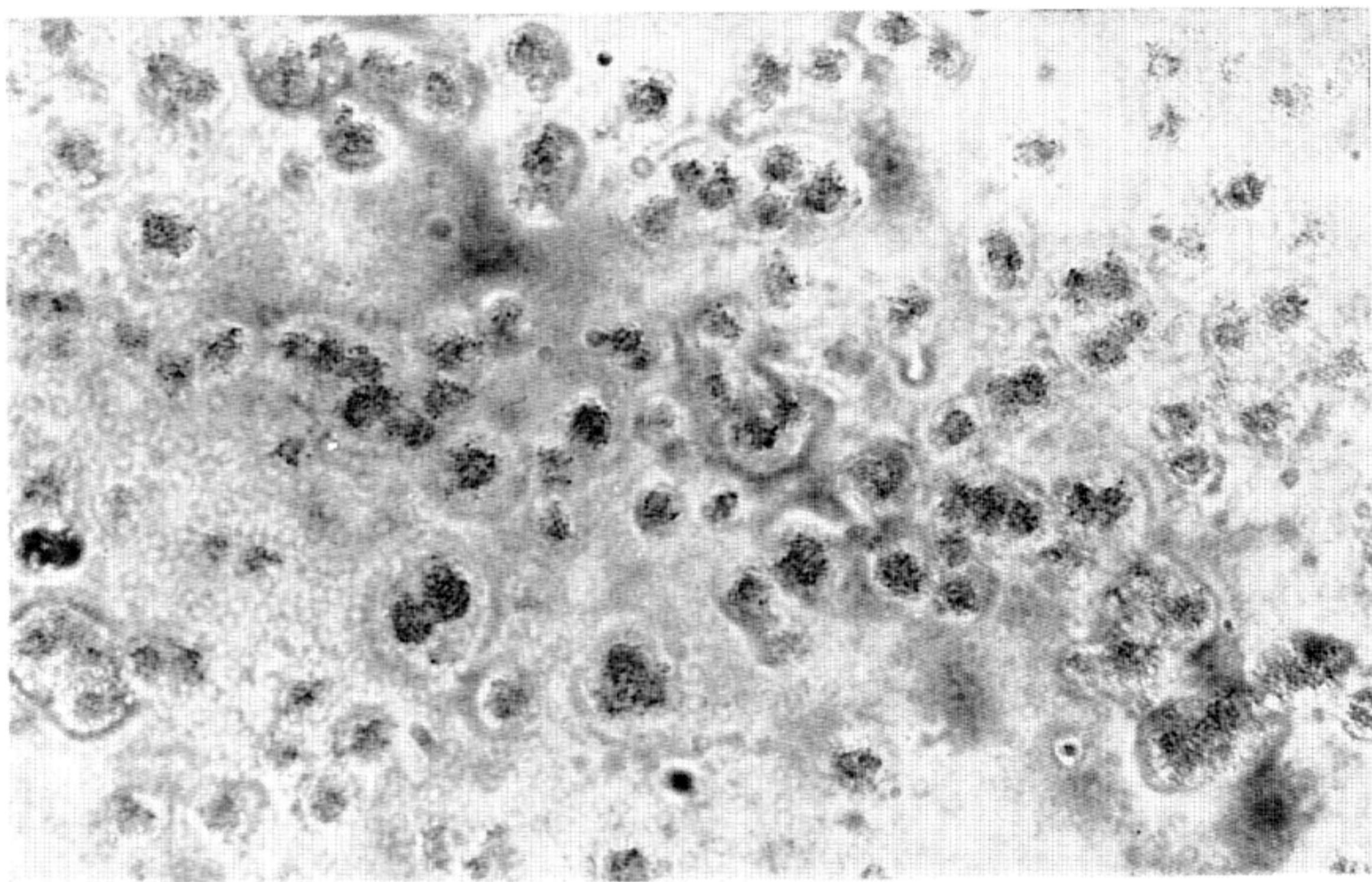
Obr. 1. Kolonie L-formy *Corynebacterium pyogenes hominis*, kultivace 5 dní. Nativní preparát, zvětšeno 100krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 2. L-kolonie na půdě bez penicilinu, uprostřed kolonie revertující v bakteriální formu. Nativní preparát, zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 3. Průkaz hemolyzinu L-formy. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 4. Detekce fosfolipázy D, produkované L-formou, in vitro (inverzním CAMP testem). Velikost $\frac{3}{4}$. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 5. Degenerativní změny L-kolonií po předchozím 3denním působení homologní kultury. Nativní preparát, zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle — Obr. 6. Pokročilá degenerace téže kultury až lýza tvořících se kolonií po 7denním působení. Zvětšeno 60krát. Foto MUDr. M. Chýle



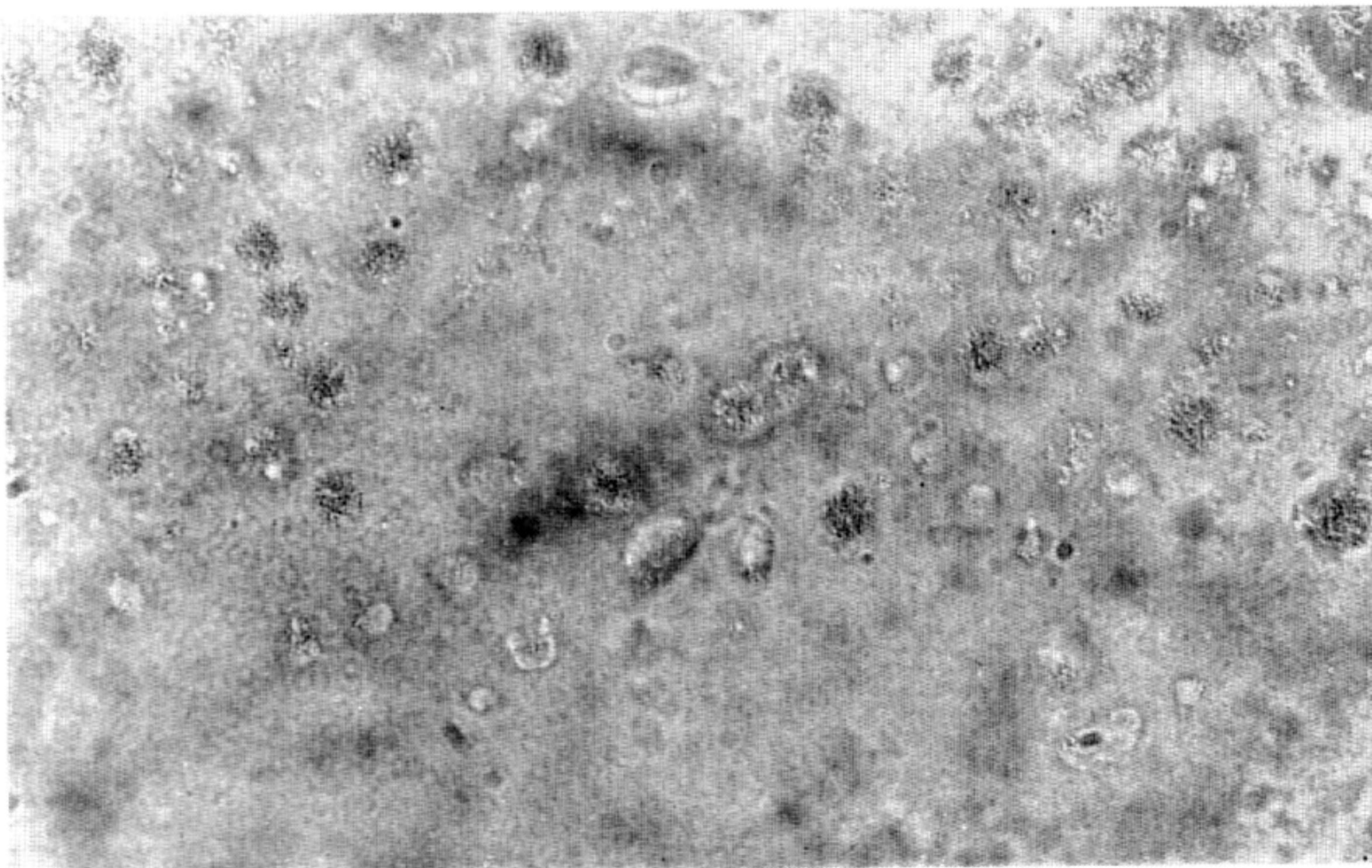
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6