

# Nový druh anaerobního mikroba, tvořícího pohyblivé kolonie.

Prof. MUDr F R. PATOČKA — doc. MUDr V. ŠEBEK.

Předloženo dne 4. května 1951.

Znalosti striktně anaerobní vaginální flory — zvláště za pathologických stavů — jsou stále ještě nedokonalé. Opětovaně se stává, že jsou z poševních výtoků vypěstovány anaeroby (většinou nesporulující), které mohou být zařazeny jen obtížně a s určitou reservou. Při tom je pravděpodobné, že jde často o dosud neklasifikované druhy, které snad již byly pozorovány, ale dosud nebyly nikým zevrubně prostudovány.

Za několikaleté spolupráce zdařilo se nám isolovati řadu takových mikrobů, z nichž některé byly dokonce i pathogenní pro zvíře. Mezi nimi byly druhy, které v mezinárodní literatuře byly uznány jako nové. Jelikož jsme shodně s řadou autorů zajedno, že taxonomie anaerobních mikroorganismů nesporulujících je v úplných začátcích a stejně tak i naše vědomosti o jejich fysiologickém, příp. pathologickém významu v ženském pohlavním ústrojí, zpracováváme tuto otázku systematicky dále. Při tom občas prokážeme mikroby zajímavých vlastností, z nichž jeden je předmětem této práce. I když jde o mikroba, jenž vyvolával zřetelně toxicke reakce u zvířat, jak bude níže uvedeno, nemůžeme tvrditi, že byl příčinou obtíží pacientky, o níž referujeme. Přesto se nám však podařilo na něm zachytiti fenomen tak podivuhodný, že jsme se odhodlali jej šíře popsati, a to tím spíše, že mezi striktními anaeroby jde o vůbec první přímý průkaz tohoto zjevu, pozorovatelný za použití zvláštní metodiky pod mikroskopem.

Klinicky běželo o dlouhodobý a diagnosticky značně nejasný případ. Žena 39letá, která asi 8 let trpěla neurčitými nervovými potížemi, zjistila, že má pravidelné teploty kolem  $37,5^{\circ}$ . Protože nervové potíže i teploty se stávaly trvalými, podstoupila všeobecná vyšetření a léčení, jejichž výsled-

kem byla také extrakce několika zubů s granulomy, tonsilektomie a návrh na apendektomii. Vedle toho byla léčena autovaccinami, vypěstovanými z krčních a nosních nátěrů, sulfonamidy, penicilinem, neurosedativy atd. Žádné z vyšetření nepřineslo vysvětlení stavu. Bylo pomýšleno na nejrůznější důvody teplotné elevace: Appendicitis, Pharyngitis, Bronchiectasie, Endocarditis, Cystopyelitis, Tbc, podněty hormonální a diencefalické.

Asi po roce byl konsultován gynaekolog, jemuž se stala nápadnou souvislost horeček s menstruační teplotní křivkou: Počínala se zvedati vždy v době ovulační a vyvrcholila počátkem menstruace (až  $37,8^{\circ}$ ), načež v druhém a třetím dni jejího trvání rychle poklesla k normě. Menstruace byla vždy pravidelná, typu 28denního, normálně trvající, nebolestivá, ale v praemenstruálním čase předcházena bolestmi vpravo nad pupartským vazem a následovaly po ní obvykle záchvaty silné migrény. Nemocná, intelligentní a vzdělaná žena, byla krajně nervosní, střídavých nálad a různých potíží, velmi se zhubla a trpěla střídajícími se bolestmi v kloubech, v krajině srdeční, v podpažních žlazách a v pravém hypogastriu, prchavými a svědívými exantheme a střídajícími se pocity horka s mrazením.

Gynaekolog našel citlivé, leč nepatrné zduření pravého vejcovodu těsně při odstupu od děložního rohu, a mírný bělavý hlenovitý výtok z hrdla děložního, který býval zvláště hojný při rozčilení. Palpační citlivost se časem rozširovala i v oblast coekální. Při mikroskopickém a kultivačním vyšetření výtoku nalezeny v hojném počtu poševní bičíkovci, aerobně: Enterococcus a Pseudodiphtherie, anaerobně: *B. melaninogenicus* a Gram + vláknité Bacterium (*Catenabacterium*) spolu s ojedinělými degenerovanými formami Döderleinova lactobacila — BK nenalezeny.

Pochva jevila známky lehkého chronického zánětu, který však nepůsobil pacientce žádných subjektivních potíží.

Ježto gynaekologický nález byl ze všech vyšetřovacích výsledků nejzřetelnější a teplotná křivka jevila zřetelou závislost na menstruačním cyklu, nebylo možno odmítнуть domněnku, že příčina choroby leží v pohlavních orgánech. Byla proto zavedena obvyklá celková i místní protizánětlivá gynekologická léčba a připojena též autovaccina, leč zlepšení nastalo jen v bakteriologickém poševním nálezu: Nejprve vymizeli bičíkovci, později i *Catenabacterium* s průvodnou florou, kdežto Döderleinovy bacily nabyla rychle převahy. Sedimentace 5/10, BM + 1, tlak krevní 110/90, obraz krevní normální. Celkové subjektivní obtíže i teploty se zlepšily jen přechodně a neupravila se trvale ani ztráta tělesné váhy (54 kg). Teprve po roce se ukázaly opět ojedinělé trichomonády, ale *Catenabacterium* se již vůbec nevyskytlo. BK nebyly vypěstovány ani při opakování kultivacích z menstruačního tamponu. Zlepšení, která z gynekologického léčení nastala, byla jen přechodná a nakonec převládl opět bývalý chronický charakter, avšak tentokrát přece jen v poněkud zmírněném obrazu.

Ze všech vypěstovaných mikrobů nás nejvíce zaujalo Gram + Bacterium, tvorící vlákna, o nichž bylo při bližším šetření zjištěno, že z části

sestávají z tyčinek  $3-5\frac{1}{2} \mu$  dlouhých, seřazených v řetězce. Celistvá vlákna i řetězce byly dlouhé  $30-50 \mu$ . Segmentace vláken v tyčinky byla patrná pouze na zbarvených preparátech. V nativních preparátech působila vlákna dojmem, že kompaktní a nepřerušený obal obklopuje celého mikroba. Větvení vláken nepozorována, zato však začasté provazce, spletene z filamentosních útvarů, vznikající tím, že se jedno vlákno ovinovalo kolem druhého.

Jiným zajímavým fenomenem byl výskyt velkých kulatých tělísek na koncích nebo v průběhu vláken. Napočátku jsme je považovali za mladá stadia spor, ale později se ukázalo a to zejména hydrolysovou a tinkcí podle Robinowa, že jde o útvary, pozorované dnes u celé řady mikrobů a charakteristické zejména pro t. zv. L — formy bakteriální. Tyto združeniny, když byly podrobeny kyselé hydrolyse při temperatuře kolem  $58^\circ C$  a zbarveny podle Giemsy, ukázaly se býti složeny z přečetných chromatických granul, velmi nepatrných rozměrů, jejichž podstatou jsou patrně nukleiny desoxyribosového typu.

Skutečné spory v čistých kulturách neprokázány ani po několikanedělní kultivační době. Stejně tak střední resistance mikroba proti teplu (velmi hustá bouillonová kultura snesla sice ještě někdy zahřátí na  $70^\circ C$  po 30 minut, ale nikdy ne teplotu  $80^\circ C$ ) nesvědčí pro mikroba sporulujícího. Proto jsme se odhodlali prozatím zařaditi tohoto mikroba mezi anaerobionty nesporulující. Vzhledem k tvorbě vláken, složených většinou z dlouhých řetězců Gr + tyčinek, klasifikujeme ho provisorně jako mikroba z genus *Catenabacterium*.

Dosud není bezpečně rozhodnuta také otázka pohyblivosti tohoto *Catenabacterium*. Bičíky se nám nepodařilo prokázati ani na velmi mladých, ani vyspělých kulturách, žádnou z běžných barvících metod. Stejně tak jsme nikdy nezjistili pohyblivost vláken či řetízků ve vyspělých kulturách (v nativních preparátech) za anaerobních podmínek. I tato okolnost přispěla k tomu, že jsme mikroba zařadili mezi *Catenabacterium*, která běžně platí za mikroby nepohyblivé. Granulosová reakce ve vláknech byla negativní. Grampositivita, jak tomu bývá u anaerobů, byla naprosto zřetelná v mladých kulturách. Stářím se mikroby stávaly Gram labilními až Gram negativními.

V nativních preparátech ze starých kultur bylo lze zhusta pozorovati oválná tělíska, dosahující až velikosti kvasinek, vysoce lámající světlo a nažloutlé barvy. Běžnými metodami se tyto útvary nebarvily. Jak se později ukázalo, šlo pravděpodobně o tukové kapénky, uvolňující se rozpadem kultury, které snad jsou analogické cholesterolovým kapkám, prokázaným Patridgem a Klienbergerovou, v kulturách *Streptobacillus moniliformis*.

Optimum vzrůstu bylo kolem  $35^\circ C$ . Mikrob byl velmi striktně anaerobní, bouillonová kultura z počátku vykazovala lehký zákáł, z něhož při dalším vzrůstu vznikl jemný vatovitý sediment, při čemž zbytek bouillonu se úplně vyjasnil.

Kolonie v hloubce agaru byly dvojího druhu: jednak čočkovité, jednak nepravidelné s hrbolek. Vzrůst na povrchu krevního agaru za striktně anaerobních podmínek po 3—4 kultivačních dnech se projevil tvorbou povlaku jemně voskovité konsistence. Tento povlak byl hustě proset okrouhlými vyvýšeninami, jež odpovídaly (jak se při dalším studiu ukázalo) isolovaným koloniím mikroba, které splýváním výbězků, jež tyto kolonie vysílaly, se doplnily v souvislý povlak. Na žádné z použitých zvířecích krví neprojevil mikrob ani stopy hemolysy. Byla-li kultivace na povrchu krevní plotny předčasně přerušena, takže povlak dosáhl pouze asi  $\frac{1}{3}$  nebo  $\frac{1}{2}$  povrchu kultivační půdy, ukázal se na neporostlé ploše krevního agaru zajímavý zjev: Několik mm až 1 cm od okrajů povlaku, bylo lze pozorovat na krvi četné, drobné kulaté kolonie mikroba o průměru  $\frac{1}{2}$ —2 mm, z nichž některé byly zcela bez spojení s povlakem, k jiným vedla spirálovitě zatočená, dvojitě konturovaná stopa od okraje povlaku. V centru spirály se pak nacházela již uvedená malá kolonie. Již z tohoto nápadného fenomenu bylo patrno, že jde patrně o *Bacterium*, obdařené výjimečnou schopností vytvářet t. zv. pohyblivé kolonie a proto rozhodnuto, že bude učiněn pokus, potvrditi existenci tohoto vzácného fenomenu přímým pozorováním rostoucí bakteriální kultury.

Biochemické vlastnosti mikroba nebyly markantní. Stupeň acidity kultury v játrovém bouillonu po 14denní kultivaci byl asi pH 6,2. Plyn byl produkován v sotva viditelných množstvích, rovněž po velmi dlouhé inkubační době. Prakticky žádný z 21, běžně k tomuto cíli užívaných uhlohydrátů nebo polyalkoholů, nebyl fermentován po době 18 dnů anaerobní kultivace. Mléko bylo po velmi dlouhé době a jen zčásti koagulováno. Gelatina nebyla nikdy zcela proteolysována, po 14dnech se stala zřetelně měkká. Ani vaječný bílek, ani fibrin, ani koagulované serum nebyly změněny. Acetoin nebyl produkován, zato však zjištěny stopy indolu, NH<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>S. Nitráty byly redukovány. V primokultuře a v několika následovných pasážích byl mikrob zřetelně pathogenní pro labotorní zvířata, neboť vyvolával podkožní absces v místě inokulace u morčete a hnisavou meningitis při subdurálním vstříknutí králíkovi. Tyto slabé, ale zřetelné pathogenní vlastnosti však se v pozdějších subkulturách zcela ztratily.

Z velké řady mikrobů, s nimiž jsme ho porovnávali podle jejich popisů ve světovém písemnictví, odpovídal náš mikrob nejvíce anaerobu, nalezenému Junganem a popsanému znovu Prévotem, jako *Catenabacterium filamentosum*. Cat. fil. je však zřetelně sacharolytické, nereduкуje nitráty, produkuje acetoin, tvoří plyn a rychle koaguluje mléko. Rovněž lipoidní kapky a tvorba pohyblivých kolonií jsou neznámy u Junganova mikroba. Necháváme tedy otázku přesného zařazení prozatím otevřenu. V případě, že by u našeho mikroba skutečně šlo o *Catenabacterium*, bylo by s největší pravděpodobností druhem novým, pro něhož nejvhodnější pojmenování by bylo *Catenabacterium rotans*.

Uvedli jsme již z kraje, že jsme považovali za svůj hlavní úkol, pro studování pohyblivosti kolonií našeho mikroba, a to přímou cestou, což až do té doby u anaerobů děláno nebylo. K tomuto cíli jsme použili modifikace Fortnerovy mikrokultury. Krycí sklíčka většího rozměru byla poněra do hodnotného agaru s přidáním thioglykolové kyseliny ve zředění 1 : 10.000. Agar, zachycený na sklíčku v tenké vrstvě rychle ztuhl, takže bylo snadné, jej sterilním skalpelem s jednou strany odstraniti úplně a na druhé straně z něho ponechat pouze čtvereček, právě tak veliký, aby dobře zapadal do hlubiny na podložním sklíčku, užívaném pro tkáňové kultury. Ze 2—3 dny staré kultury Catenabacteria, vyrostlého na krevní plotně, se přenesl obsah kličky doprostřed agarového čtverečku. Nato se jeho okraje naočkovaly asi 1 mm širokou kulturou *Serratia marcescens*. Krycí sklíčko se položilo kulturou dovnitř nad vyhloubeninu v podložním sklíčku a jeho okraje se k němu neprodyšně připevnily směsí parafinu a vaseliny. Bylo nutno pracovati velmi rychle, neboť *Catenabacterium* je abnormálně citlivé na  $O_2$ . Trochu vodních par, usazených na krycím sklíčku, nerušilo nijak mikroskopická pozorování. Kulturu bylo lze dobře sledovati malým i velkým zvětšením suchého optického systému a byla-li vrstva agaru dostatečně tenká, dokonce i vodní immersí.

Kultura byla prohlédnuta ihned po naočkování pod mikroskopem a popisána. Pak vložena do termostatu a po řadě kultivačních hodin vždy znovu bedlivě prohlížena.

Při prvním prohlížení inokula zjištěno, že sestávalo z amorfní masy, v níž bylo lze rozeznati blíže okrajů krátké tyčinky a zcela na okraji i ojedinělá vlákna, která bez jakéhokoliv uspořádání, všemi směry vystupovala z naočkované kultury. Vzrůst inokula počal u našich pozorování po době mezi 9—18 hod. při 37° C. Ostaní průběh záležel především na rychlosti vzrůstu a tato byla, jak samozřejmo, úměrná kvalitě použitého agaru, jeho redoxpotenciálu a stáří i množství inokula. Tak na př. nejlepší výsledky jsme dostali pouze na agaru s thioglykolovou kyselinou, na němž inokulum bují velmi rychle. Zde byl fenomen pohyblivých kolonií, jak bude níže popsán, daleko nejlepší. Bylo-li použito agaru bez thioglykolové kyseliny, vyrůstaly z centrálního inokula provazce mikrobiálních vláken, jež se zčásti vraceły zpět, takže vznikl konečný útvar, podobající se kolonii bacila anthraxu, při čemž formace rotujících mikrokolonii byla absolutní výjimkou.

Počátek vzrůstu, sledován pod mikroskopem, se projevil tím, že mezi neuspořádanými vlákny, vyčnívajícími z naočkované kultury, se nahromadila větší kvanta relativně krátkých tyčinek, podobných těm, o nichž jsme se zmínili při popisu inokula, ale mnohem více lámajících světlo. Tyto refraktiní útvary, které byly z kraje patrný bez jakéhokoliv systému na periferii inokula, se během několika dalších kultivačních hodin počaly uspořádávat v pravidelné shluky diskovitého tvaru, hladkých, kulatých obrysů. Tyto diskovité až polokulovité útvary pak seděly, jakoby připraveny na periferii

rostoucího inokula, při čemž z něho vynikaly pouze malým úsekem svého obvodu.

Po několika dalších hodinách se vnitřní struktura disků změnila. Jednotlivé tyčinky v něm ztratily svůj přesný tvar, ale téměř současně se na periferii disku počalo rýsovat prvé vlákno, které se jako spirála stáčelo stále více dovnitř a k centru diskovitého aglutinátu. Nakonec se celý útvar proměnil v plochá kolečka, nebo ve velmi husté prsténce, jejichž průměr kolísal mezi 60—200  $\mu$ . Na prstencích i kolečkách bylo zřetelně viděti, že byla vytvořena z jedné vrstvy vláken, stočených spirálovitě v prstencový útvar.

Nejzajímavějším zjevem však bylo, že ploché prsténce vláken i kolečka nebyly útvary stacionárními, nýbrž se pohybovaly, a to dokonce dvojím způsobem. Především se otáčela kolečka kolem své vlastní osy rychlostí, která byla úměrná jejich velikosti a stáří kultury. Čím byla kultura mladší a kolečko menší, tím byl otáčivý pohyb rychlejší. U kultur 2denních byl pohyb velmi pomalý a koncem 3. dne pravidelně přestal úplně. V několika případech jsme naměřili, že kolečko o průměru asi 150  $\mu$ , z kultury 30 hod. staré, se otočilo jednou kolem své osy průměrně za 1 minutu. Otáčení kolem vlastní osy se dělo většinou proti směru hodinových ručiček. Vzácněji byl pohyb opačný. U některých zvláště velikých koleček bylo lze pozorovati současný pohyb oběma směry. Vnitřek se pohyboval ve směru a periferie proti směru hodinových ručiček. Tento pohyb však nebyl jediný. Současně s otáčením se uvolnilo kolečko z jej obklopujícího inokula a velmi pomalu se pohybovalo centrifugálně k okrajům kultivační půdy.

Pokud bylo lze rozeznati na těchto nativních preparátech větším zvětšením a jak bylo zjištěno na barvených obtiskových preparátech, skládal se prsten z velikého počtu vláknitých bakterií nebo řetízků, v nichž se občas objevila hruškovitá zduřenina, odpovídající shora popsaným velkým chromatickým těliskům. Mimo tato kolečka se čas od času vyprostilo z inokula i jednotlivé dlouhé vlákno, které se velmi pomalu klouzavým pohybem a v širokém polokruhu (který je podle všeho rovněž úsekem spirály) pohybovalo centrifugálně směrem k periferii. Stávalo se zhusta, že takové vlákno po sobě zanechalo na povrchu agaru jen zvolna mizící stopu.

Pohyb těchto vláken netrval nikdy dlouho. Pokud bylo možno pozorovati, zdálo se, že se tato vlákna nejenom pohybovala klouzavě centrifugálně, nýbrž že se i otáčela kolem své dlouhé osy, což bylo lze vyvzozovati z toho, že jednak měnila svůj tvar, jednak z faktu, že když se setkala 2 takto putující vlákna, počala se otáčeti kolem sebe.

Často jsme pozorovali, že se z některých rotujících koleček uvolnila vlákna, která se prodlužovala, až dosáhla okraje jiného kolečka. S tímto kolečkem se spojila, čímž byl vytvořen mezi oběma kolečky most, který vznikáním dalších vláken stále sílil, až se obě kolečka proměnila v nepravidelnou ovální formaci, na níž již žádného pohybu nebylo lze viděti.

Jak již výše uvedeno, trval pohyb koleček zřetelně pouze prvních 48 hod. Třetího dne se zvolňoval, až se jeho koncem zastavil. Celkový pohled na mikrokulturu menším zvětšením byl velmi zajímavý. Z rozrostlého a zvětšeného centrálního inokula, které z naočkovaného fragmentu kultury se proměnilo ve velikou a uspořádanou bakteriální kolonii, vycházela stále nová a nová vlákna i větší či menší prsténce, příp. kolečka, která nesporně odpovídala mikrokoloniím bakteria. Tyto mikrokolonie, jejichž pohyb se mezitím zastavil, obklopovaly ve vzdálenosti několika mm až i  $1\frac{1}{2}$  cm původní kulturu, při čemž některé z nich byly s ní zřejmě spojeny provazci vláken, kdežto jiné zůstaly zcela odděleny prázdným prostorem agaru, jako samostatné jednotky, připravené k dalšímu vzrůstu. V následujícím počaly mikrokolonie ztráceti svůj plochý charakter a měnily se v trojrozměrné konvexní bakteriální kolonie okrouhlých kontur, na nichž už složení z jednotlivých vláken nebylo více patrno. Tím byl vzrůst mikrokultur v podstatě ukončen a vzhledem k tomu, že asi současně byly také vyčerpány živiny z poměrně malé kultivační plochy, nastávaly při další inkubaci změny regresivní, svědčící o postupující degeneraci jak jednotlivých vláken, tak celých kolonií.

Plynulý postup těchto degenerativních změn se sice nepodařilo vždycky stejně dobře zachytiti, ale v případech, kde se tak stalo, vypadaly asi následovně: První známkou nastávajícího rozpadu bylo objevení se velkého počtu drobnějších granul v průběhu vláken. Během dalších dnů stávala se celá kolonie jakoby průhlednější, její struktura mizela a pouze její obrysy a četná granula uvnitř byly ještě viditelné. V centru kolonie se pak téměř pravidelně objevila neurčitá kapka nažloutlé tekutiny (patrně jde o lipoid), jež jest asi produktem metabolismu nebo autolysy mikroba. Po úplném rozplynutí kolonií, se tato kapénka uvolnila, nabyla okrouhlého nebo oválného tvaru a stala se podobnou erythrocytu nebo kvasince. Podle všeho šlo o tytéž útvary, jaké popsány shora při zhodnocení mikrobiální morfologie a o kterých předpokládáme, že jsou analogické s cholesterolovými kapkami, prokázanými Patridgem a Klienbergerovou v kulturách *Streptobacillus moniliformis*.

Porovnáme-li vzrůst mikrokultur s popisem vzrůstu na plotnách, jak byl shora podán, vidíme téměř úplnou analogii. Uvedli jsme již, že při předčasném přerušení makrokultury lze zachytiti zřetelně stadium cestujících mikrokolonií. Ježto však mohutná vrstva krevního agaru skýtá mikrobu daleko více vzrůstových možností, je pochopitelné, že vlákna vyrůstající z jednotlivých mikrokolonií se navzájem proplétají, až nakonec vytvoří kompaktní povlak, v němž malé kolonie úplně mizí, větší se pak projevují pouze hrbolatými vyvýšeninami, jimiž je povlak mnohočetně poset. V anaerobní makrokultuře velmi nápadný a kuriosní fenomen pohyblivých kolonií nemůže býti přímo pozorován, neboť otevření plotny znamená okamžité zrušení anaerobních podmínek, jež opět vede k zastavení pohybu kolonií.

Pozorování tak zajímavého a v mikrobiální říši poměrně vzácného fe-

nomenu, jako je tvorba rotačních i odstředivě pohyblivých kolonií, přímo vyzývá ke snaze o vysvětlení příčin této neobvyklé bakteriální schopnosti. Především jsme zjistili, že náš případ je první, kdy tento zjev mohl být přímo sledován u striktně anaerobních mikrobů. Jak bude níže uvedeno, je u některých Clostridií také předpokládán, ale přímé pozorování pohybu dosud chybí. Všechna Clostridia, která jsou podezřelá z tvorby pohyblivých kolonií, a všechny dosud popsané aerobně rostoucí bacily, u nichž tvorba pohyblivých kolonií byla viditelná, jsou mikroby obrvené a tedy individuálně pohyblivé. Je pak nasnadě, že rotační i lokomoční pohyb celé bakteriální kolonie se vykládal jako výslednice pohybu jednotlivých mikrobiálních tyčinek. V případě našeho Catenabacteria je však situace asi jiná. Nepodařilo se nám u něho prokázati bičíky a i velmi mladé kultury, zkoušené v nativním stavu za anaerobních podmínek, byly zcela nepohyblivé. Výjimkou byl klouzavý pohyb zcela ojedinělých vláken, pozorovaný v mikrokultuře, ale ani ten netrval dlouho. Bylo tedy na místě hledati příčinu pohyblivosti někde jinde, zejména v metabolismu mikrobů. Příkladem k tomu nám byla Rackerova práce. Racker studoval t. zv. „plazení“ t. j. známý vzrůstový fenomen u *Bacterium proteus*. Friedemannovi i nám se podařilo zjistiti, že v plazivém předvoji dlouhých vláken rostoucího *protea* se vytváří (byť i velmi vzácně) po krátkou dobu rotující kolečko z dlouhých mikrobiálních forem, které se však po čase opět rozplyne. Zdá se tedy, že „plazení“ *protea* a tvorba pohyblivých kolonií jsou fenomenem velmi blízkým.

Racker zjistil, že hlavní podmínkou plazivého vzrůstu *protea* je přítomnost glutaminové kyseliny v kultivační půdě. Na půdách známého složení bez glutaminové kyseliny vyrůstal *proteus* vždy v uzavřených koloniích a nikdy se neplazil, ačkoliv obrvení a lokomoční pohyblivost jednotlivých bakteriálních tyčinek zůstala plně zachována. Zdá se tedy podle této práce, že zjev, blízký tvorbě pohyblivých kolonií, není nutně výslednicí pohyblivosti jednotlivých tyčinek, nýbrž že má jiné, a to metabolické i fyzikální předpoklady.

Pokoušeli jsme se o docílení vzrůstu Catenabacteria alespoň na polodefinovatelných půdách, což se nám skutečně zdařilo v tekutém prostředí podle Bernheimera (běžně se užívá k produkci streptolysinu) za dodatečného přidání thioglykolové kyseliny. Nepodařilo se nám však přiměti mikroba ke vzrůstu na tuhé půdě podobného složení. Proto jsme provedli pokus tak, že jsme mikrokulturu založili na agaru se zředěným bouillonem, tedy na půdě relativně chudé. Tvorba mikrokolonií byla na ní skutečně pouze naznačena. Ve vlastním pokuse jsme k též půdě přidali glutaminovou kyselinu v lehkém nadbytku. Za těchto kultivačních podmínek byla i na chudší půdě docílena tvorba hojných a velmi čile rotujících mikrokolonií. Zdá se tedy, že i pro tvorbu otáčivých kolonií je snad možno předpokládati glutaminovou kyselinu jako důležitý faktor.

Z dalších činitelů je jistě důležitým střední stupeň vlhkosti povrchu

kultivačního prostředí. Toto lze poměrně lehko docílit v anaerobní mikro-kultuře, jež se rovná mírně vlhké kultivační komůrce.

Třetím nejdůležitějším činitelem je rychlosť vrůstu, jež je opět úměrná celkové výživnosti kultivační půdy, jejímu oxydoredukčnímu potenciálu a velikosti inokula. Jen rychle rostoucí kultura má schopnost vytvářeti rotující kolonie.

Tím konečně dospíváme k náznaku toho, jak by bylo možno vysvětliti vznik pohybu kolonie bez nutnosti, vykládati jej součtem lokomoční pohyblivosti jednotlivých tyčinek. Tvorba pohyblivé kolonie jest podle nás patrně *vzrůstovým fenomenem*. Není vyloučeno, že rychlým narůstáním jednotlivých vláken do délky vzniká napětí, které při schopnosti vláken udržeti se v uzavřeném celku, obdobném spirále (soudržnosti spirály snad napomáhají námi pozorované obaly bakteria), se projeví uvedením celé mikrokolonie do rotačního pohybu.

### Diskuse.

Pokud jsme mohli zjistiti v přístupné literatuře, jest námi pozorovaný mikrob prvý ze striktních anaerobů, u něhož byly zjištěny přímým a soustavným pozorováním pod mikroskopem rotující a odstředivě se pohybující kolonie. U aerobních mikrobů byl ovšem podobný zjev zjištěn v několika případech, ale i zde jde o schopnost mezi schizomycetami velmi vzácnou. Jak se zdá, první, kdo vůbec popsal tvorbu pohyblivých kolonií, byl Muto, jenž roku 1904 prokázal v hlíně nesporulujícího mikroba (podle Lehmanna příbuzného proteu), jejž nazval *Bacillus helixoides*. Po něm učinil podobné pozorování (ovšem jako zcela výjimečné), na některých kmenech *protea Friedemann* (osobní sdělení). Roku 1935 popsal Roberts pohyblivé kolonie u aerobní sporulující tyčinky, zv. *Bacillus rotans*. O něco později Jordan našel tyčinku, příbuznou předcházejícím, již nazval *Bacillus circulans*, a to proto, že se kolonie více točily kolem své vlastní osy nežli postupovaly centrifugálně (náš mikrob jeví pohyblivost, která je patrně příbuzná tomuto poslednímu druhu). Smith a Clark v roce 1938 studovali podrobnosti pohybu kolonií u *Bacillus alvei*, jenž byl spíše centrifugálně lokomoční, a porovnávali ji s pohyblivostí mikrokolonií Gr — nesporulující tyčinky, isolované ze zažívacího traktu dešťovky, která je spíše téhož druhu, jako u *Bacilla circulans*. Jsou to právě tito autoři, kteří tvrdí, že pohyblivost celé kolonie je výslednicí pohyblivosti jednotlivých mikrobů. Shinn (1938) provedl dokonce kinematografické zachycení a rozbor pohybu bakteriálních kolonií *Bacilla alvei*. Celý zjev sestával z 5 různých fází. Russ-Münzerová popsalala týž fenomen u mikroba, jejž isolovala náhodně v laboratoři jako znečištění. Dodatečně byl jí nalezený mikrob identifikován jako varianta *Bacilla alvei*. Turner a Eates popsalí půdního sporulujícího aerobního bacila, jehož

kolonie se rovněž pohybovaly. Tvrdí o něm, že je mikrobem odlišným od všech dříve popsaných.

Všechny dosud citované práce pojednávaly o pohyblivých koloniích u mikrobů aerobních, jejichž přímé studium na kultivačních půdách nenařáželo pochopitelně na žádné obtíže. O mikrobech striktně anaerobních jsme našli, kromě našeho pozorování, pouze 2 jiné práce. Prvá (Turner a Eates 1941) suponuje tvorbu pohyblivých kolonií u *Clostridia oedematiens*, *Cl. septica*, *Plectridia tetani* a několika kmenů *Cl. botulinického*. Přitom ovšem si autoři pohyb nikdy přímo neověřili, považují ho pouze za velmi pravděpodobný na základě zjištění dceřiných mikrokoloní mimo okraj naočkované makrokultury. V případě anaerobních *Clostridií* vedla k těmto mikrokoloniím téměř vždy dvojitá stopa lehce naznačeného bakteriálního vzrůstu od mateřské kolonie. Z roku 1948 pochází naše pozorování, jak popsáno v této práci. R. 1950 pak popsal Mandia pohyblivé kolonie *W. perfringens* v polotuhé kultivační půdě, ač mikrob sám byl zcela nepohyblivý. Metodika Mandiova pozorování je odlišná od naší a asi ani zjev není zcela identický, ale nesporně našemu velmi blízký. Jeho práce dokazuje, že pohyblivost bakteriálních kolonií nemusí být a většinou také není výslednicí pohyblivosti jednotlivých mikrobů. S tím souhlasí i naše pozorování, které se rovněž týká mikroba, jenž ve většině pokusů spontánního pohybu nejevil. Podle domněnky naší i jiných jest tvorba spirálovitě zahnutých výběžků *Bacillus cereus varietas mycoides* (většinou jsou ohnuty doleva), dále plazivý vzrůst protea, četných druhů mikrobů striktně anaerobních a některých druhů vodních spirochet (Dyar) více nebo méně rudimentárními stupni vývoje téhož fenomenu, jehož vyvrcholením jsou pohyblivé nebo rotující bakteriální kolonie. Většina autorů, zabývajících se studiem příčiny vzniku pohyblivých kolonií zdůrazňuje přímou souvislost spontánního pohybu jednotlivých mikrobů a pohybu celé kolonie. Nověji to na př. znovu naznačují ve své studii Murray a Ehler, i když jejich výklad není již tak apodiktický jako starších autorů.

Podle našeho názoru však nelze směšovat čilou lokomoční pohyblivost jednotlivých bakterií, vyvolanou z převážné části bičíky s pohyblivostí celé hmoty mladého předvoje bakteriálních kultur, kterou označujeme běžně jako její „plazení“ (viz *proteus*). Někteří se snaží sice i toto „plazení“ svéti na součin motility jednotlivých tyčinek, v tomto případě spojených masou zvláštní pojivové či snad pouzderné substance (Mandia). Pohyb plazících se vláken není však podle nich v tomto případě neusměrněně lokomoční, nýbrž jde o polarisované, hadovité prohýbání jednotlivých, abnormálně dlouhých tyčinek, jak ho suponuje Pijper pro pohyb bakterií vůbec.

I my jsme již dříve upozornili na pravděpodobnost Pijperovy teorie o flexibilitě a vnitřních elastických silách bakteriální protoplasmy, jakožto možných příčinách pohybu alespoň u některých schizomycet. Nesporně se takto pohybují bakterie z ordo *Myxobacterales*, alespoň některé druhy

z ordo Spirochaetales a Chlamydobacteriales. Podobně jako ony snad i některé mikroby z ordo Eubacteriales mají v určité své životní fázi pohyblivost, jež platí pro rostoucí kolonii jakožto celek a která je rozdílná od nekoordinované a nepolární lokomoční pohyblivosti jednotlivých tyčinek.

Životní fáze, v níž můžeme — byť i vzácně — pozorovati tento zvláštní a brzy ustávající druh bakteriální pohyblivosti, je období nejaktivnějšího mikrobiálního metabolismu, t. j. konec t. zv. vzniku v růstové lag fáze a počátek logaritmického množení. Jak známo, je většina bakterií v této vzniku v růstové fázi mnohem mohutnější a zejména jejich délkové rozměry jsou mnohem větší. Extrémních rozměrů dosahují právě mikroby, vyznamenávající se plazivým růstem, jak lze snadno sledovati přímo na rostoucí kultuře Bact. protea nebo na preparátech mladých kultur Plectridia tetani. Jelikož u plazivě rostoucích mikrobů pohyb tohoto předvoje, t. j. nápadně dlouhých až vláknitých tyčinek, v pravém slova smyslu hadovitě lezoucích, nastává bezprostředně po vzniku latenci inokula, nabízí se srovnání plazivé části kultury s výše uvedeným, metabolicky a energeticky nejaktivnějším stadium mikrobiálního vzniku.

Uvedli jsme již, že tvorba pohyblivých kolonií je podle našeho názoru pravděpodobně pouze extrémním a zvláštním případem fenomenu „plazení“. Catenabacterium, sledováno plynule v mikrokulturách po fázi vzniku latence, se rozrůstá z banálních mas neuspořádaných tyčinek do vláken, která mají tendenci uspořádati se spirálovitě a rychle rostou dále do délky.

U plazivých mikrobů (stejně tak u našeho Catenabacteria) je toto stadium pouze přechodné a dříve či později končí. Dlouhá, úhořovitě se pohybující vlákna protea se rozpadají na normální tyčinkovité formy téhož mikroba, jež se čile individuálně pohybují, nekoordinovaně a bez polarity. Stejně tak mikrokolonie Catenabacteria se pohybují pouze potud, pokud jsou složena z dlouhých, záhadným pouzdrem opatřených vláken. Pak se zastaví a rozpadají v drobnější tyčinky, jež již bez určitého uspořádání a bez jakékoliv stopy spontánní pohyblivosti dorůstají v trojrozměrnou kolonii.

Považujeme tedy za pravděpodobné, že některé bakterie, především ony plazivě rostoucí a pak ty, které tvoří rotační a pohyblivé kolonie, jsou nadány ve své nejaktivnější metabolické a vzniku v růstové fázi tak velikým množstvím energie, že se tato projevuje i navenek zvláštním druhem pohyblivosti, jež je patrná elastickou pulsací celého protoplasmatu, podobně, jak to Pijper předpokládá. Ve zvláštních případech, jak je tomu u Catenabacteria, je místo hadovitého pohybu spíše tendence k rychlému řazení vláken do spirálních útvarů. Rychlým růstem těchto vláken ve spirálách a snad i jejich otáčením podle podélné osy vzniká napětí (nikoliv nepodobné tomu, jež je známo u hodinkového pera), které se pak přenáší na celý soudržný útvar ploché a kulaté mikrokolonie. Konečným resultátem tohoto napětí je rotační pohyb celé kolonie, jak jsme jej mohli sledovati přímo pod mikroskopem. Jeho další výslednicí je druhý, mnohem pomalejší centrifugální pohyb kolonie směrem od inokula.

Uznáváme, že náš výklad vzniku pohyblivých a rotačních kolonií je stejně hypothetický jako uvedené výklady jiných autorů. Má však snad alespoň tu přednost, že koordinuje moment jejich vzniku s nejaktivnější energetickou a metabolickou fází vývoje bakteriální kultury. V této se mohou skutečně uplatnit síly, jichž, v tak význačné intensitě, vyspělá bakteriální kultura již postrádá. Kromě toho byl námi celý postup vývoje kolonií tak, jak jej popisujeme a vykládáme, skutečně také sledován pod mikroskopem, čehož u jiných autorů většinou nebylo. Konečně náš výklad platí i pro mikroby, jež nejsou de norma lokomočně pohyblivé, jak dodatečně potvrdil, pro některé kmeny *Welchia perfringens*, *Mandia. Pijper*ův názor o pohyblivosti mikrobů zde také nachází opěrné body, nikoliv jako fenomen obecně platný u pohyblivých schizomycet, nýbrž pouze pro některé jejich druhy a jenom pro určitou fazu jejich růstového cyklu.

### Souhrn.

Autoři popisují vláknité anaerobní *Bacterium*, isolované z hnisavého vaginálního výtoku, Gr + a podle dosavadních nálezů nesporulující i nepohyblivé, které se pokusili zařaditi do genus *Catenabacterium*, jako pravděpodobně nový druh. Mikrob byl v prvních kulturách slabě, ale zřetelně pathogenní pro laboratorní zvířata, později této vlastnosti pozbyl. *Bacterium* mělo několik zajímavých vlastností, neboť vytvářelo v průběhu vláken velká, kulatá tělíska, v starších kulturách podléhalo někdy autolyse a produkovalo, podobně jako *Streptobacillus moniliformis*, kapénky lipoidů. Jeho nejzajímavější vlastností však bylo, že vytvářelo za anaerobních podmínek rotující a odstředivě pohyblivé mikrokolonie, jejichž vznik, pohyb i další vývoj bylo možno sledovati v mikrokulturách přímo pod mikroskopem.

Tvorba pohyblivých kolonií u mikrobů je zjevem velmi vzácným a byla dosud popsána pouze asi pro 6 druhů aerobních sporulujících bacilů a bakterií, mezi něž patří na př. *Bacillus helicoides*, *alvei* a *circulans*. Z anaerobních bakterií je autory popsáne *Catenabacterium* vůbec první, u něhož tento zajímavý vznustový fenomen byl skutečně přímo prokázán. Jinou metodikou byl dodatečně s velikou pravděpodobností zjištěn (pouze co vzácná výjimka) u některých kmenů *Welchia perfringens*. Jako pravděpodobně existující (z nepřímých kultivačních fenoménů) jest uváděn také u některých anaerobních Clostridií, jako je *Cl. septicum* a *Plectridium tetani*.

Jelikož jde o mikroba nepohyblivého, je nutný jiný výklad mechanismu rotujících kolonií, než jaký je běžný pro druhy výše uvedené, jež s výjimkou *Welchia perfringens* patří vesměs mezi mikroby, čile se pohybující bičíky.

Podle názorů autorů je tvorba rotujících kolonií pouze zvláštním a extrémním případem t. zv. „plazení“ bakteriálních kultur, jež je typické ku př. pro *Bacterium proteus*. Sledování vzniku plazivé kultury i rotujících kolonií ukázalo pravděpodobným, že obojí spadá patrně do konce lag a do

počátku logaritmické fáze bakteriálního množení. Jedním z projevů velikého kvanta energie, jíž je mikrob v této fázi obdán, je pohyb celé masy kultury polárně usměrněný a jiného rázu, než běžný lokomoční pohyb dospělého mikroba. Snad jest podobný onomu, jímž Pijper vykládá pohyblivost bakterií vůbec.

Masa rychle rostoucích vláken Catenabacteria, jež má tendenci k růstu do spirály a která je držena pohromadě hlenovou substancí neznámého charakteru, vyvolává v celém systému kulaté a ploché mikrokolonie nesporně napětí, jehož konečnou výslednicí je síla, jíž se celá kolonie dostane do rotačního pohybu.

Podle toho by byl vznik rotujících kolonií zvláštním případem růstového fenomenu. V práci se konečně diskutuje i možný vliv jiných faktorů, jako redoxpotenciálu a glutaminové kyseliny na vznik pohyblivých kolonií.

## LITERATURA

- CLARY J.: Bact. 38: 491, 1939.  
DYAR: J. Bact. 54: 483, 1947.  
EGGERTH: J. Bact. 30: 277, 1935.  
FORTNER: osobní sdělení.  
FRIDEMANN: osobní sdělení.  
GAUSE: Biochem. 7, 1, 1942.  
GINS: Ztrbl. f. Bact. Orig. I. 132: 129, 1934.  
HASTINGS: Science 75, 1932.  
de JONG: Arch. f. microbiol. 4: 36, 1933.  
JUNGANS: Compt. rend. Soc. de biol. 66: 112, 1909.  
MANDIA: J. Bact. 60, 3, 275, 1950.  
MURRAY a ELDER: J. Bact. 58, 3, 351, 1949.  
PATRIDGE a KLIENEBERGER: J. Path. a. Bact. 52: 219, 1941.  
PIJPER: J. Path. a. Bact. 58: 325, 1946.  
PIJPER: J. Bact. 53: 275, 1947.  
PRÉVOT: Manuel de classification et de détermination des bactéries anaerobies, Paris:  
Masson et Cie. 1940.  
PRÉVOT et al.: Ann. Inst. Pasteur 73: 224, 1947.  
PRÉVOT et al.: Ann. Inst. Pasteur 73: 409, 1947.  
PATOČKA-REYNES: Ann. Inst. Pasteur 73: 599, 1947.  
PATOČKA-PRÉVOT: Ann. Inst. Pasteur 73: 504, 1947.  
PATOČKA-ŠEBEK: Čs. gynaekologie, 12, 1—2, 1947.  
PATOČKA-ŠEBEK: Časopis lék. českých, 1948.  
REPACI: C. r. soc. de biol. 68: 216, 1910.  
ROBERTS: J. Bact. 29: 229, 1935.  
RUSS-MÜNZER: Ztrbl. f. Bact. Orig. I. 142: 175, 1936.  
SHINN: J. Bact. 36: 491, 1938.  
SMITH and CLARK: J. Bact. 35: 59, 1938.  
TURNER a. EATES: Austr. J. Exper. Biol. A. M. Sc. 19: 161. 1941.  
TURNER a. EATES: Austr. J. Exper. Biol. A. M. Sc. 19: 168, 1941.

# R O Z P R A V Y I L. TŘÍDY ČEŠSKÉ AKADEMIE

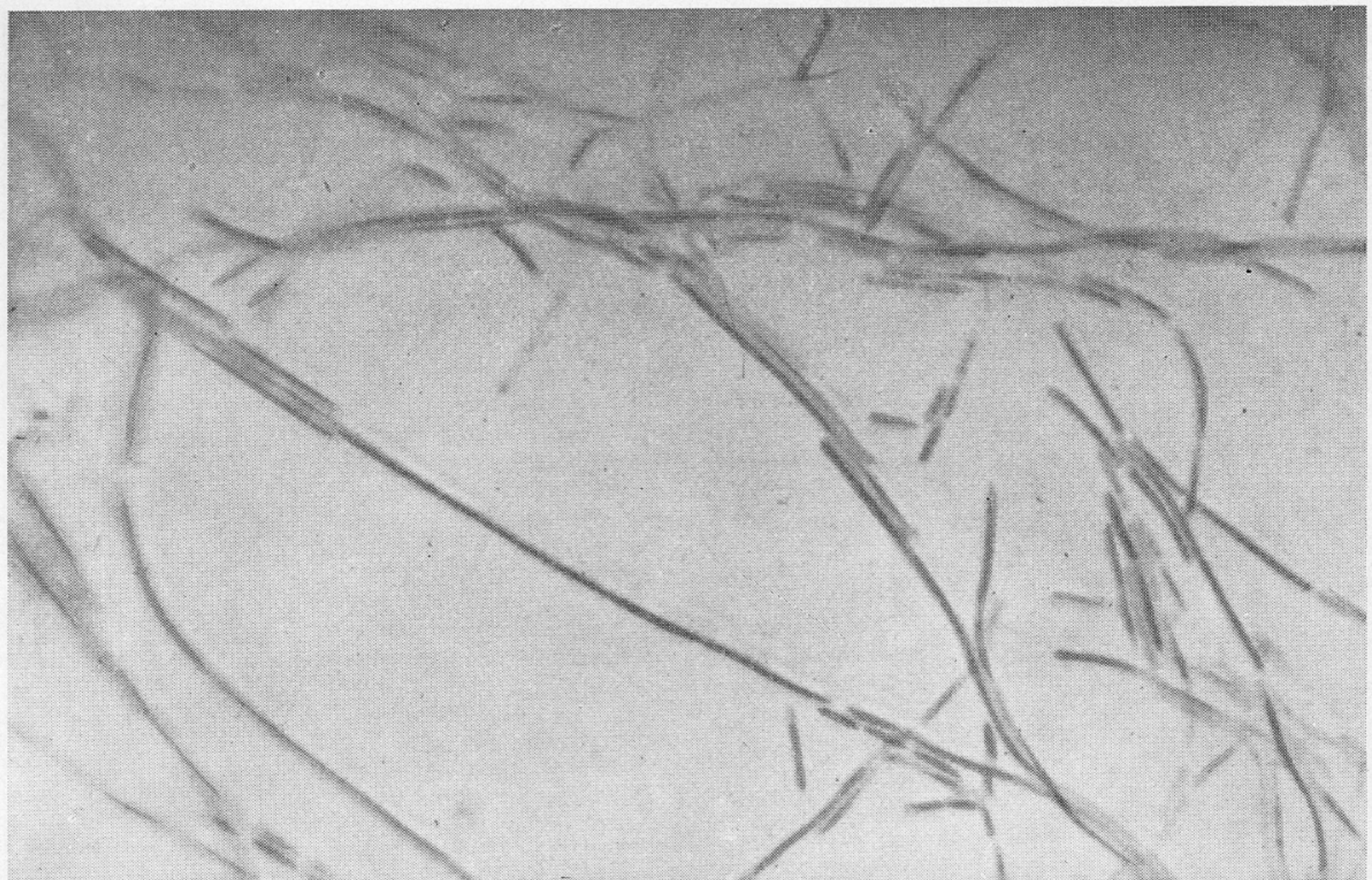
Vydavatel: Česká akademie věd a umění. — Redaktor prof. dr. Julius Komárek. — Redakce  
a administrace: Praha I, Národní tř. č. 3. — Vytiskla Státní tiskárna, n. p., závod os

Ročník LXI (1951), číslo 24.

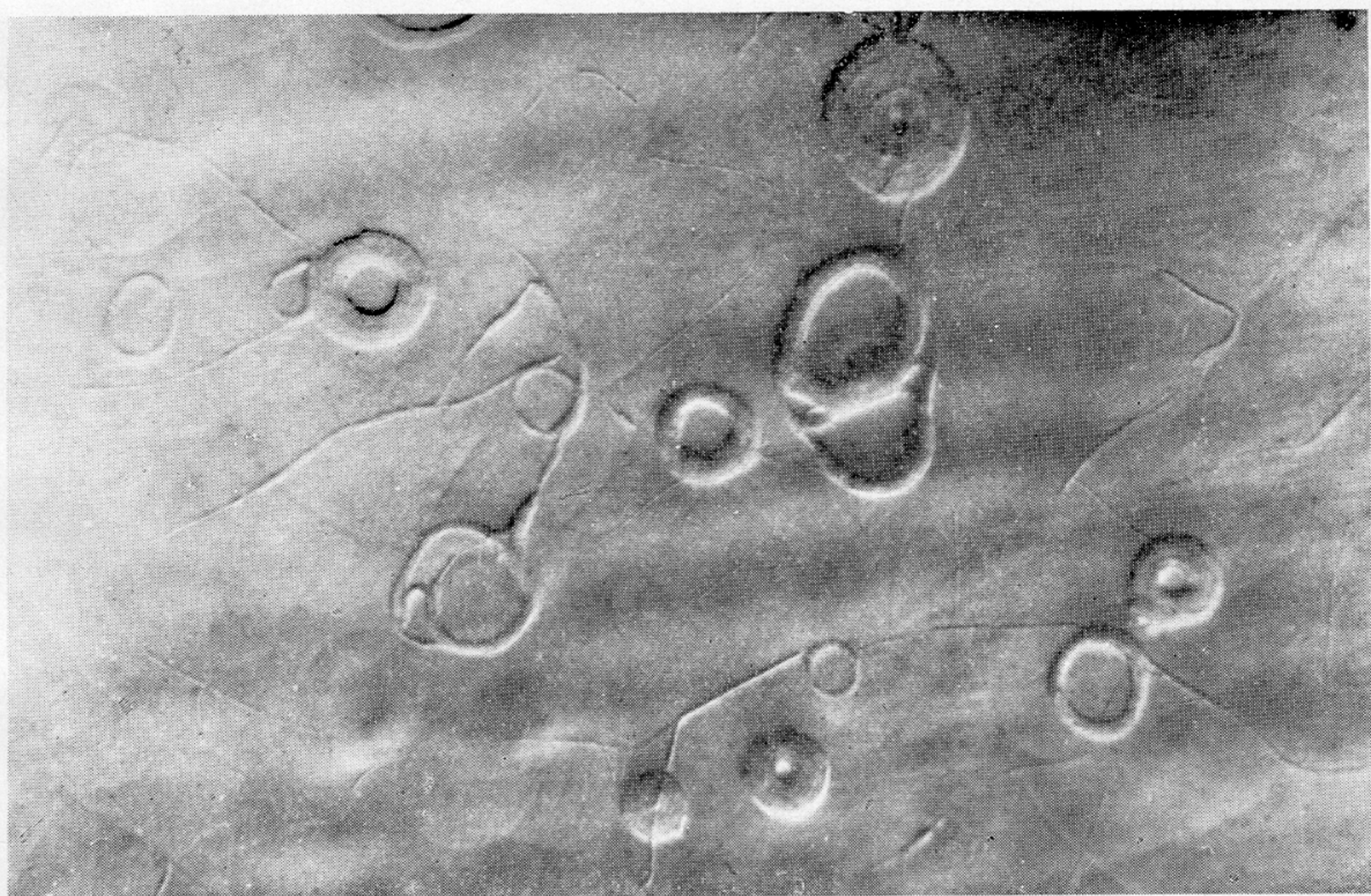
Cena Kčs 15 —

V Praze 24 IX 1952

PATOČKA-ŠEBEK: Pohyblivé kolonie anaerobního mikroba.

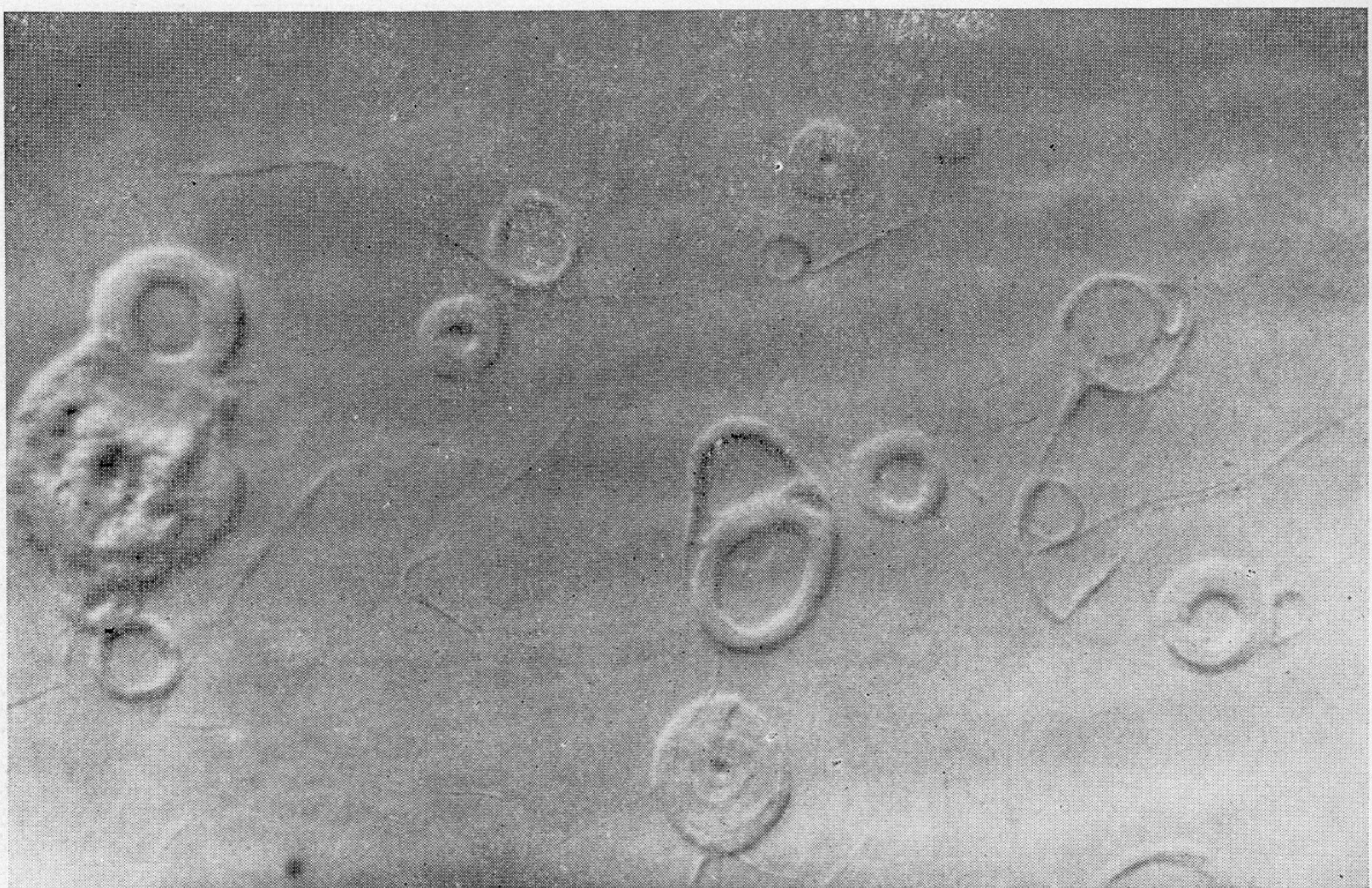


Obr. 1. Mikroskopický preparát z bouillonové kultury Catenabacteria. U dlouhého vlákna, směřujícího šikmo dolů, je naznačen obal vláken.

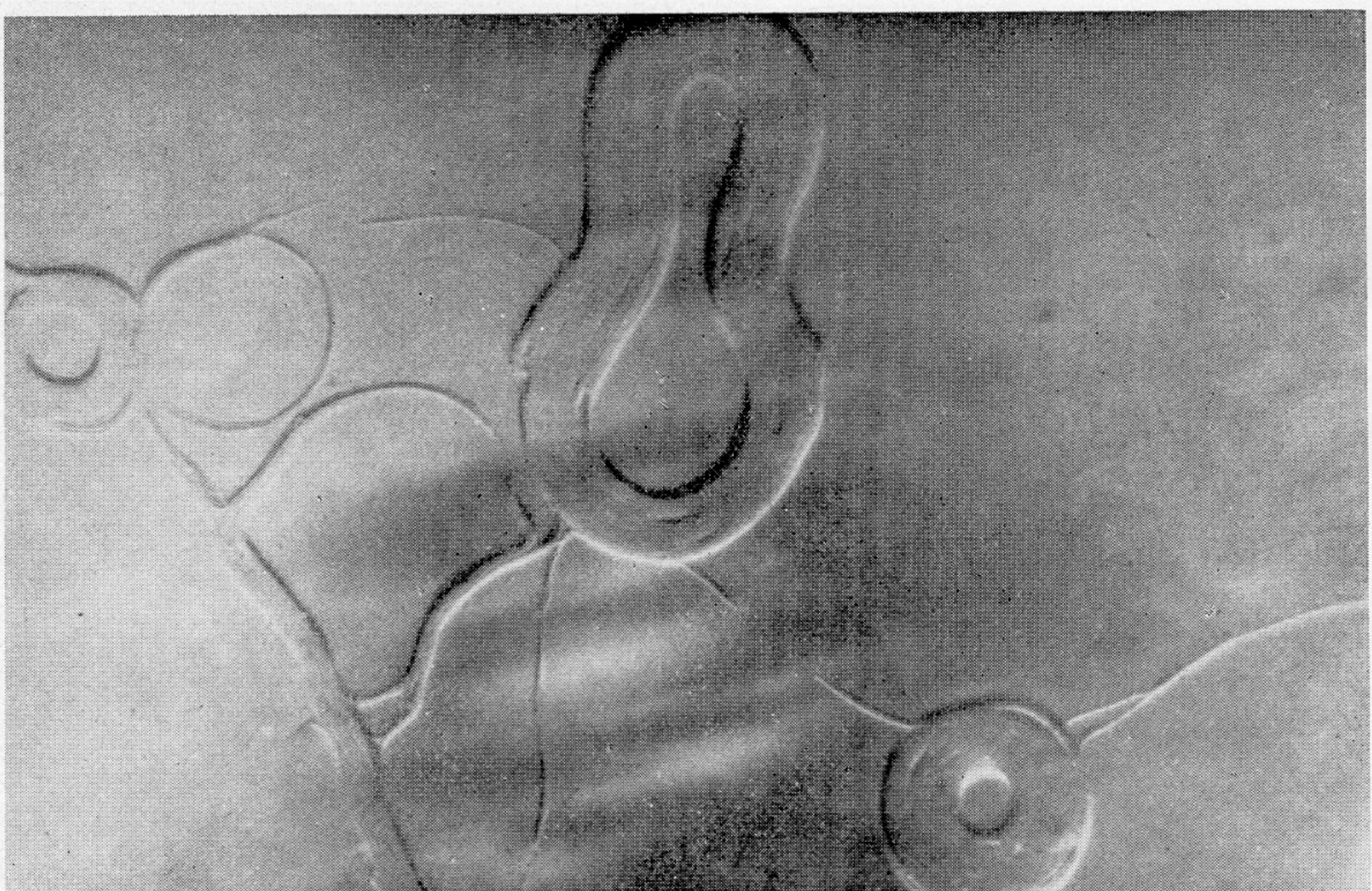


Obr. 2. Fotografie anaerobní mikrokultury, znázorňující kolečka i prstence z okolí inokula. Klouzavý pohyb isolovaných vláken je patrný ze stopy, jež zůstává na agaru.

PATOČKA-ŠEBEK: Pohyblivé kolonie anaerobního mikroba.

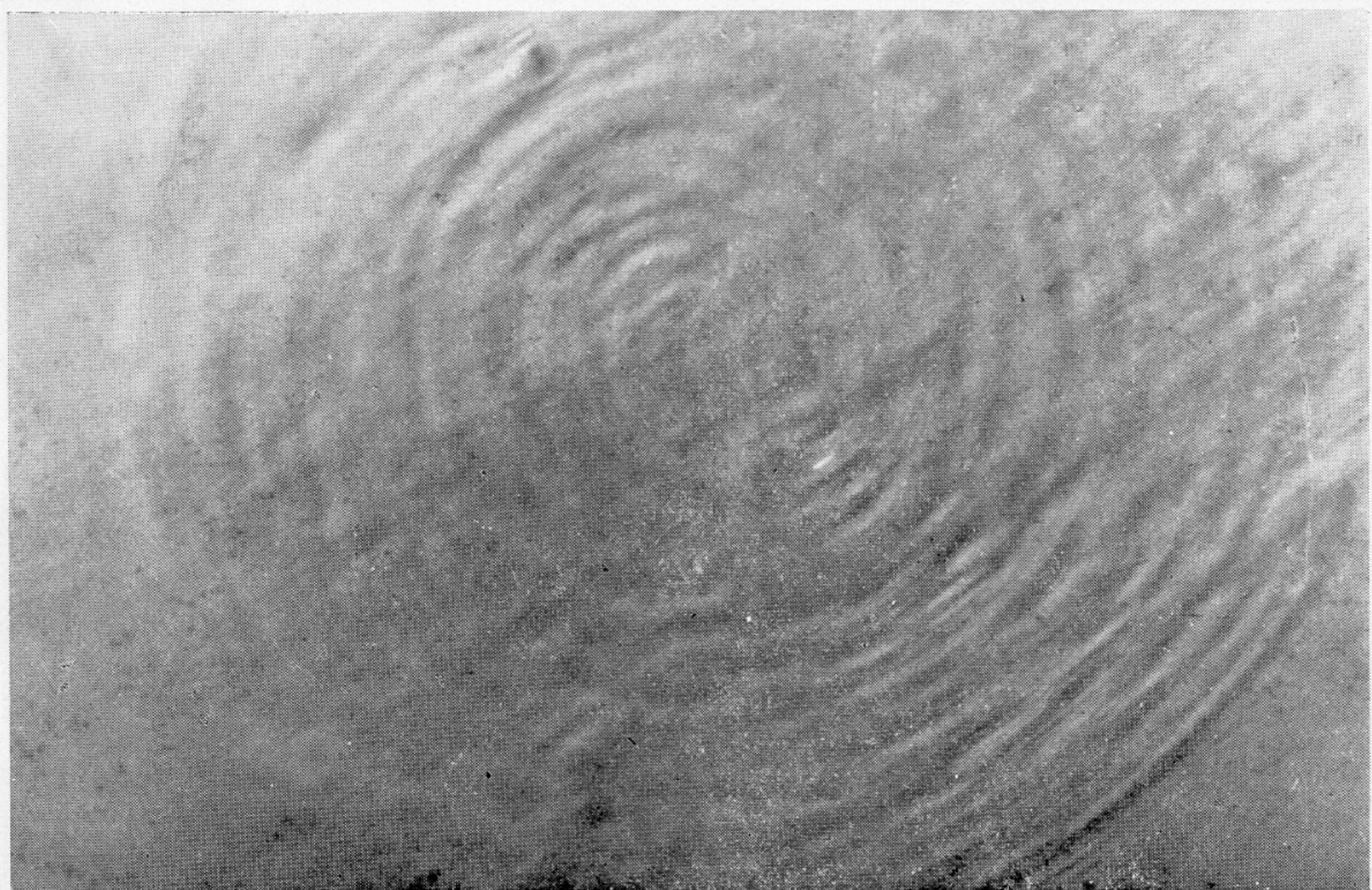


Obr. 3. Pokročilejší stadium prstenců a točících se koleček.

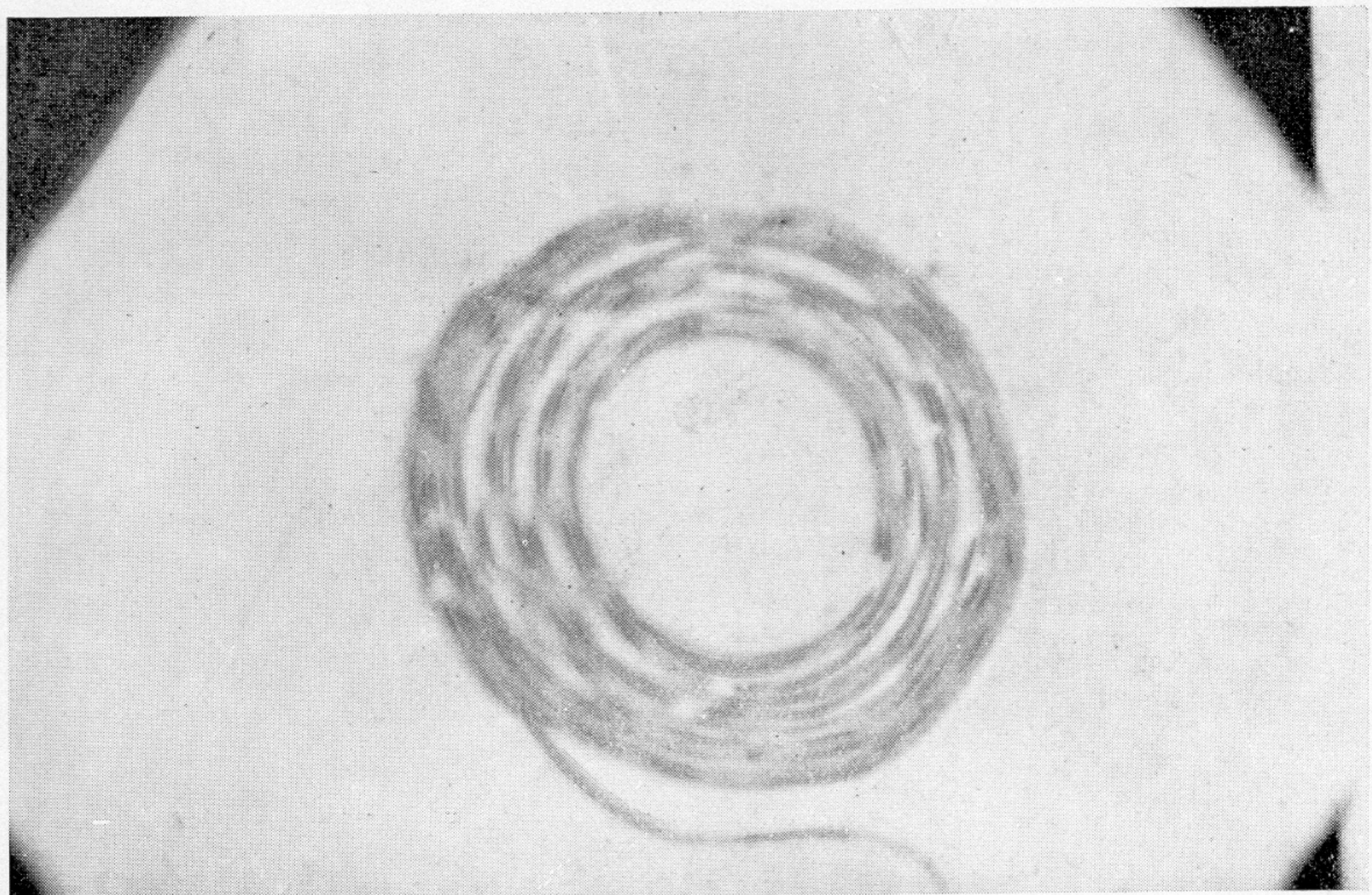


Obr. 4. Typické kolečko, fotografované větším zvětšením, prameny vláken a útvary, vzniklý splynutím obou sousedících prstenců.

PATOČKA-ŠEBEK: Pohyblivé kolonie anaerobního mikroba.



Obr. 5. Rotující kolečko velkým zvětšením. Velmi dobře patrná je spirála z vláken.  
Celek není nepodobný peru u hodinek.



Obr. 6. Obtiskový preparát rotujícího kolečka, barvený karbolfuchsinem. Jednotlivá  
vlákna jsou dobře viditelná a v jejich průběhu lze viděti velká, kulatá tělíska.

PATOČKA-ŠEBEK: Pohyblivé kolonie anaerobního mikroba.



Obr. 7. Nativní preparát z mikrokultury, v níž se pohyb koleček již zastavil. Některé rotující mikrokolonie dorůstají na trojrozměrné, polokulovité bakteriální kolonie o amorfní vnitřní struktuře.