ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

# POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 70

Přihlášeno: 30 06 88 /PO 52-88/

Právo přednosti od 30 09 65

Zveřejněno: Journal of Bacteriology
Vol. 90, No 3, str. 803-807, 1965

Uděleno: 07 12 92

Vydáno: 31 12 92

MDT
576.85

Autor objevu: VINTER VLADIMÍR RNDr. PhMr. DrSc., PRAHA

Název objevu: Mikrocyklová sporogenese u bacilů

Předmět objevu: Vlastnost primárních vegetativních buněk Bacillus cereus a Bacillus megaterium, vzniklých po vyklíčení spor, spočívající ve vytvoření nové spory při omezení hladiny živin.

Klidové formy zástupců rodu Bacillus, spory, představují jednu z nejodolnějších forem mikrobů vůbec. Vytvářejí se ve vegetativních buňkách bacilů jako odpověď na snížení hladiny živin v prostředí. Spory jsou životaschopné po několik stovek let. Mnohostranná odolnost spor je již známa více než sto let. Trvala však tisíciletí, než lidstvo pochopilo podstatu mnoha nemocí způsobených sporulujícími mikroorganismy, než zjistilo, jak se chránit před sepsí při chirurgických zákrocích, jak se chránit před kažením potravin, a podobně. Všechny moderní sterilizační techniky v chirurgii, potravinářském a farmaceutickém průmyslu, a v posledních desetiletích při sterilizaci těles vysílaných do kosmu, používají stále bakteriálních spor jako test-organismů na účinnost příslušné procedury. Na druhé straně jsou zástupci rodu Bacillus též výhodnými producenty prakticky důležitých enzymů, antibiotik, zásobních látek, entomocidních toxinů, atd., a to právě v předsporulačním nebo sporulačním stadiu vývoje kultury. Poválečná výroba farmaceutických preparátů, urychlený vývoj konzervárenství, ale i jiné aspekty resistence spor bakterií, si vynutily studovat nejen fáze vývoje vegetativních buněk bacilů, ale zvláště podmínek určujících vytváření spor, tedy podmínek determinujících represi genomu vegetativního a derepresi genomu sporulačního. O vnitřních, molekulárně biologických aspektech těchto procesů nebylo v 50. a zčásti i v 60. letech nic známo. Studium spor bakterií se v těchto letech rozdělilo do dvou hlavních linií. Jednou z nich bylo studium vzniku odolnosti prespor, zrajících spor uvnitř sporangií a uvolněných spor vůči chemickým a hlavně fysikálním faktorům, např. vysušení, enormně vysoké teplotě, UV-záření a x-záření. Neméně důležitou byla druhá linie studia kritické fáze vývoje vegetativních buněk, kdy už jsou schopny sporulovat. Fysiologický stav vegetativní buňky má bezesporu vliv na tvorbu plnohodnotné spory se všemi vlastnostmi resistence. Skutečnost, že v kulturách za laboratorních podmínek docházelo ke sporulaci až po mnohonásobném dělení buněk, vedla k hypotese, že pro tvorbu spor je předcházející fáze vegetativního množení buněk nezbytná.

Jistým pokrokem v určení fáze vývoje, kdy kultura bacilů je již schopna vytvářet spory, byl soubor prací o t.zv. "endotrofní sporulaci". Experimentálním principem těchto prací bylo převádění kultur z konce logaritmické fáze růstu, případně ze začátku fáze stacionární, do destilované vody nebo fysiologického roztoku. Autoři, kteří tyto pokusy zahájili, došli k závěru, že po tomto náhlém omezení exogenních živin dochází k degradaci preexistujících makromolekul a k výstavbě makromolekul sporangia ze vzniklých štěpných produktů (Hardwick W.A., Foster J.W. 1952 : On the Nature of Sporogenesis in Some Aerobic Bacteria. J.Gen.Physiol. 35 : 907-927, Hardwick W.A., Foster J.W. 1953 : Enzymatic Changes During Sporogenesis in Some Aerobic Bacteria. J. Bacteriol. 65 : 355-360, Foster J.W., Perry J.J. 1954 : Intracellular Events Occurring During Endotrophic Sporulation in Bacillus mycoides. J. Bacteriol. 67 : 295-302). Jiná, serioznější práce, však souběžně ukázala, že po tomto drastickém nutričním šoku dochází k lysi většiny buněk, a že vytváření sporangií je výsledkem "kanibalismu", tedy využití štěpů rozpadlých buněk pro vegetativní pomnožení a následnou sporulaci u buněk přeživších nutriční stress (Powell J.F., Hunter J.R. 1953 : Sporulation in Distilled Water. J.Gen.Physiol. 36 : 601-606). Všechny další práce pak byly zamě-

řeny konzervativně na nutriční depleci v kulturách až v pozdních stadiích vývoje, která byla charakterizována buď tvorbou zásobních látek (Black S.H., Gerhardt P. 1963 : Endotrophic Sporulation. Annals N.Y. Acad. Sci. 102 : 755-762, Black S.H., Hashimoto T., Gerhardt P. 1960 : Calcium Reversal of the Heat Susceptibility and Dipicolinate Deficiency of Spores Formed "Endortrophically" in Water. Canad. J.Microbiol. 6 : 213-224, Pelcher E.A., Fleming H.P., Ordal Z.J. 1963 : Some Characteristics of Spores of Bacillus cereus Produced by a Replacement Technique. Canad. J. Microbiol. 9 : 251-258), nebo objevením se jakéhosi sporulačního faktoru (sporogenu) v určité fázi pozdního vývoje kultury (Srinivasan V.R., Halvorson H.O. 1963 : "Endogenous Factor" in Sporogenesis in Bacteria. Nature 197 : 100-101, Srinivasan V.R. 1965 : Intracellular Regulation of Sporulation of Bacteria. Nature 197 : 100-101, Srinivasan V.R. 1965 : Intracellular Regulation of Sporulation of Bacteria. V knize "Spores III" /ed.L.L.Campbell, H.O.Halvorson/, American Soc. Microbiol., str. 64-74).

Na základě molekulárně biologických technik, vypracovaných v prvé polovině 60. let v oblasti cytodiferenciace bacilů, se došlo k závěru, že každá část cyklu, tedy postgerminační vývoj, vegetativní množení, presporulační a sporulační období, jsou přesně determinovány tvorbou příslušných informačních ribonukleových kyselin. Tyto výsledky byly logické, neotřásly však základní představou, že sporogenese je uskutečnitelná až po mnoha děleních buněk.

Z vlastní práce, která se týkala nejen předmětu objevu, ale též charakterizace všech důležitých stadií sporogenese, klíčení a postgerminačního vývoje spor včetně rozlišení stadií vývoje termo- a radioresistence sporangií (do roku 1965 celkem 27 původních prací, viz Vinter V. :"Sporogenese bakterií", doktorská disertační práce, Praha 1967) vyplynula zřetelně následující fakta. Všechny způsoby kultivace, prováděné na víceméně konvenčních a definovaných mediích za optimálních podmínek, jsou umělé a přizpůsobené zájmům mikrobiologů : definovat změny buněk na výhodných mediích s vybranými složkami a používat tato vhodná media pro produkci důležitých metabolitů bacilů. Tento stupeň pohledu na optimální potřeby mikroorganismů byl nutný a samozřejmě je výhodný i dnes, protože vyhovuje průmyslové praksi ve všech oborech biotechnologie. Souběžně s touto snahou o maximální exploataci mikroba v průmyslu farmaceutickém, potravinářském a v jiných směrech biotechnologie, ostře kontrastuje skutečnost, že víme poměrně málo o chování mikroorganismů v jejich přírodním prostředí, to jest v půdě. Je to jeden z hlavních důvodů, proč výzkum funkce a použití mikroorganismů v zemědělství je dosud převážně empirický. Je známo, že sporulující bakterie jsou velmi důležitými složkami biologického potenciálu v půdě, kde v ekologickém souladu s plísněmi, aktinomycetami a dalšími mikroby uskutečňují užitečnou přeměnu všech organických látek, které ztratily svou aktivní funkci, v nově využitelné formě. Aktivní úloha sporulantů je možná pouze ve stavu vegetativní buňky. Podmínky v ekosystému pro množení mikroorganismů jsou prakticky vždy limitovány hladinou živin. Navíc se přírodní podmínky mohou rychle měnit, na příklad deštěm, mrazem, vysušením, a podobně. Konkurence s jinými půdními komensály o živiny v rozpuštěné formě na půdních částicích by za nepříznivých podmínek pro sporulanty znamenala, pokud

by neměly čas vysporulovat, zánik populace. I když v ložisku bohatém na rozpuštěné živiny dojde k přechodnému pomnožení buněk a k následné produkci relativně nadbytečného množství spor, je toto "plýtvání" tvorbou klidových a rozmnožovacích forem, spor, bohatě vyváženo jejich vysokou mortalitou po vyklíčení. Schopnost bakteriálních spor vyklíčit i ve velmi jednoduchém prostředí, na příklad v přítomnosti některých L-aminokyselin, monosacharidů, adenosinu, atd. (Sussman A.S., Halvorson H.O. 1966, v monografii "Spores, Their Dormancy and Germination", Harper & Row, Publishers, New York and London, 354 stran), je velmi riskantní biologický jev; v původních podmínkách při něm často dochází zřejmě ke smrti většiny sporové populace. Postgerminační vývoj spory je totiž relativně velmi náročný, zvláště na aminokyseliny a nukleové baze (Vinter V. 1965 : Commencement of Synthetic Activities of Germinating Bacterial Spores and Changes in Vulnerability of Cells During Growth. V knize "Spores III" /ed.L.L.Campbell, H.O.Halvorson/, American Soc. Microbiol., str. 25-37, Vinter V. 1966 "Spores of Microorganisms XX. Changes in the Rate of Incorporation of Praecursors of Macromolecules During Postgerminative Development of Bacterial Spores. Folia Microbiol. 11 : 392-398, Škoda J., Blažková L., Dyr J., Honzová H., Vinter V. 1967 : Spores of Microorganisms XXII. Inhibition of the Postgerminative Development of Spores of Bacillus cereus by 6-Azauracil. Folia Microbiol. 12 : 557-561, Primus G., Setlow P. 1975 : Protein Degradation and Amino Acid Metabolism During Germination of Bacillus megaterium Spores. V knize "Spores VI" /ed. P. Gerhardt, R.N.Costilow, H.L. Sadoff/, American Soc. Microbiol., str. 451-457/).

S přihlédnutím k přirozeným možnostem spory v přírodním prostředí půdy bylo nutno najít to stadium postgerminačního vývoje spory (depolymerizační období, hydratace, elongace buňky), kdy už bude schopna po náhlém nutričním stressu vysporulovat. Tento postup znamenal zásadní rozdíl od shora jmenovaných postupů, ve kterých byla schopnost vytvořit sporu hledána až na konci množení buněk. K simulaci příležitostné dostupnosti živin v prostředí pro klíčení a postgerminační vývoj spory, byla provedena serie pokusů, které postupně vedly k předmětu objevu. Cílem práce bylo zjistit, zda nutriční stress může vést u buňky v postgerminačním období pouze ke smrti, nebo zda se v průběhu fylogenese mohly vytvořit též jiné možnosti přežití. Pracovními modely byly zástupci druhů Bacillus cereus a Bacillus megaterium a pro jejich kultivaci byla použita tekutá živná media obsahující baktopepton nebo kaseinový hydrolysát (0,3 %), glukosu (0,1 %), fosfát (0,34 % $KH_2PO_4$) a stopové prvky (Vinter V. 1956 : Sporulation of Bacill. Consumption of Calcium by the Cells and Decrease in the Proteolytic Activity of the Medium During Sporulation of Bacillus megaterium. Folia biologica (Prague) 2 : 216-226). Kultury byly při 30 °C vzdušněny na třepačce. Jednou z cest jak simulovat nutriční limit bylo zřeďování tohoto media (5x až 50). Druhou cestou bylo vynechání jedné složky media, při čemž se osvědčilo zvláště vynechání nebo snížení hladiny fosfátu. Třetím směrem byla centrifugace kultury po vyklíčení spor a přenesení do stejného objemu fysiologického roztoku a další třepání suspense. Ve všech těchto případech se v kultuře vytvořily po 10 - 15 hodinách elongované buňky se sporami (asi 20 %), označené na konci původními

obaly spory. Sporogenesi v primární vegetativní buňce jsme označili termínem "mikrocyklová sporogenese". V kultuře byly však dále přítomny i vyklíčené spory, které zastavily vývoj a malé množství dvojic. Vzhledem ke značné heterogenitě kultury bylo nutno vyvinout dokonalejší techniku výměny media.

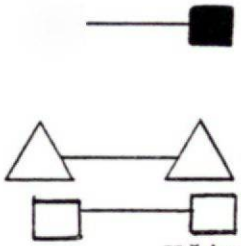
Nicméně bylo prokázáno, že při vhodné limitaci živin nebo některé složky media, vytváří část primárních elongovaných buněk, vzniklých z vyklíčené spory, nové sporangium. Tento způsob sporogenese představuje nejjednodušší model cytodiferenciace u bacilů, neboť nedošlo k rozdělení buněk. Tento nový jev byl označen termínem "mikrocyklová sporogenese".

Novou techniku rychlé náhrady živného media, umožňujícího vyklíčení všech spor, za medium neživné, bylo prokázáno, že většina elongovaných primárních buněk je schopna vytvořit novou sporu bez rozdělení. Byla provedena výměna tekutého živného media (0,3 % baktopeptonu DIFCO, 0,1 % glukosy, 0,34 % $KH_2PO_4$, stopové prvky /Vinter V. 1956 : Sporulation of Bacilli. Consumption of Calcium by the Cells and Decrease in the Proteolytic Activity of the Medium During Sporulation of Bacillus megaterium. Folia biologica (Prague) 2 : 216-226) za předehřátý fysiologický roztok, a to ve speciálně upravených skleněných kultivačních zařízeních. Vlastní kultivace probíhala ve válcových komorách s fritovým dnem (frita odpovídala našemu G 5) se zapuštěnou vzdušnící fritou (odpovídala našemu označení G 3). Dno těchto komor bylo napojeno na vývěru ; bylo tak možno odsát během 5 minut původní medium a průběžně nahradit stejným objemem fysiologického roztoku. Hustoty frit jsou uvedeny přibližně, neboť tyto pokusy byly provedeny v USA, kde značení hustot filtrů jsou jiná. Vlastní kultivační komora byla opatřena skleněnou přitavenou kyvetou pro měření absorbance na kolorimetru Klett-Summerson s filtrem č. 66. Jako inokulum byly použity promyté volné spory Bacillus cereus NCIB 8122 předem aktivované tepelným šokem (65 °C / 15 min.), takže jak vyklíčení, tak postgerminační vývoj spor probíhaly synchronně. Kultivační teplota byla 30 °C. Popis kultivačního zařízení je uveden v prioritní práci (Vinter V., Slepecky R.A. 1965 : Direct Transition of Outgrowing Bacterial Spores to New Sporangia Without Intermediate Cell Division. J.Bacteriol. 90 : 803-807). Na těchto kultivačních zařízeních byla souběžně provedena řada přenosů v různém stadiu vývoje kultury. Nejvhodnějším pro produkci sporangií bez rozdělení se ukázalo stadium zbotnání (swelling) spory, při kterém buňka zcela vyplnila vnější obal spory, exosporium. Po 12 hodinách kultivace převažovaly v kultuře primární vegetativní buňky se zralou termoresistentní sporou. Na obr. 1 jsou uvedeny základní údaje jednoho z těchto pokusů, kdy byly buňky, plně zbotnalé do exosporia, přeneseny do fysiologického roztoku. Popis jednotlivých křivek:


- procento turbidity kultury (hodnota po naočkování byla brána jako 100 %),


- celkový počet buněk, zjištěný počítáním v komůrce,


- celkový počet živých buněk zjištěný výsevem na Petriho misky s Difco agarem,



- počet spor (procento buněk přeživších zahřátí na 65 °C / 15 minut z celkového počtu živých buněk tvořících kolonii),
- procento sporangií ze všech elongovaných buněk,
- procento dvojic ze všech elongovaných útvarů.

Křivky spojené přerušovanými čarami:

- procento prespor v elongovaných buňkách (jako prespory jsou označeny světlolomné útvary s dosud nekompletními plášti a kortikální strukturou),
- procento vyklíčených spor barvitelných 1 %ní methylenovou modří.

V tomto pokusu byla nově vzniklá sporangia zahřáta na 15 minut při 65 °C. U Bacillus cereus se termoresistence při maturaci spor ve sporangiu dále zvyšuje (Vinter V. 1962 : Spores of Microorganisms IX. Gradual Development of the Resistant Structure of Bacterial Endospore. Folia Microbiol, 7 : 115-120). Po zahřátí kultury v tomto pokusu ve 20. hodině kultivace na 15 minut na 80 °C bylo zjištěno 82 % termoresistentních sporangií. Přítomná malá frakce rozdělených buněk mezitím lysovala a v kultuře byly přítomny jen obrysy stěn se zrny bez cytoplasmy (ghosts). Tyto doplňující údaje nejsou v prioritní práci uvedeny. Jen nepatrná část dvojic vytvořila morfologicky téměř normální spory. Bacillus cereus byl pro toto studium vhodný proto, že po tvorbě první vegetativní buňky zůstávají na jejím konci připojeny původní obaly spory, pláště a exosporium. Vysporulovaná primární buňka tak nesla znaky tří generací : novou sporu, její mateřskou buňku (sporangium) a relikty původní spory, plášťové struktury a exosporium. Přehledné schema těchto buněčných typů (Vinter V. 1967 : Developmental Cycle of Sporeformers : A Cellular Type of Differentiation in Bacteria. Folia Microbiol. 12 : 89-100) je uvedeno na obr. 2. Je zde znázorněna následnost buněčných forem při sporulaci primární buňky po vyklíčení spory :

A - volná klidová spora Bacillus cereus s exosporiem,
B - primární vegetativní buňka vysunutá z obalů spory,
C - primární buňka se sporou, označená na jednom konci původními sporovými obaly : plášti a exosporiem,
D - uvolněná spora vzniklá v první nerozdělené vegetativní buňce.

Na obr. 3, jsou fotografie sporangií Bacillus cereus (fázový kontrast, zvětšeno 3.500x), vzniklých z elongované buňky po vyklíčení spory :

A - primární buňka s presporou,
B - F - zralá sporangia. Pláště a exosporia původní spory jsou označena šipkami.

Výsledky tohoto pokusu ukazují, že prakticky všechny jednotlivé elongované buňky vzniklé přímo ze spory vytvořily za těchto podmínek nová sporangia a do 14. hodiny kultivace termore-

sistentní spory.

Vzhledem k tomu, že sporulace vznikla v takto zkráceném cyklu bez vegetativního množení buněk, byl nazván tento model cytodiferenciace "mikrocyklová sporogenese" (v prioritní práci "microcycle sporogenesis"). Podobné pokusy byly na uvedených kultivačních zařízeních provedeny též u Bacillus megaterium. Také v tomto případě se po přenosu vyklíčených spor na začátku prodlužování buňky (elongation) vytvořila do 12. hodiny kultivace převážně jednotlivá sporangia s plně světlolomnými a termoresistentními sporami (Vinter V., Slepecky R.A. 1965 : Direct Transition of Outgrowing Bacterial Spores to New Sporangia Without Intermediate Cell Division. J.Bacteriol. 90 : 803-807). U Bacillus megaterium existuje jiný způsob vysouvání (emergence) primární buňky ze sporových obalů, nicméně i zde byly přítomny při centrální části buňky zbytky původního pláště. Sledování a zdůraznění přítomnosti zbytků původní spory u nově vzniklého sporangia bylo pro tento zkrácený cyklus sporogenese významné, neboť, kromě průběžného mikroskopického sledování kultury, vylučovalo možnost tvoření dvojic a jejich následný rozpad.

Významná skutečnost, že ke sporulaci primární buňky u obou zástupců rodu Bacillus došlo až po 10 - 14 hodinách, svědčí o tom, že tyto buňky prošly určitou přestavbou a teprve pak byl dereprimován sporový genom. Při konvenční kultivaci v komplexním mediu, kde dochází k množení buněk, se obvykle definují stadia diferenciace buňky ve sporangium a sporu od času $t_o$, tedy od okamžiku, kdy kultura zastavila množení. Tato stadia trvají obvykle 7 - 8 hodin. Prodloužení doby tvorby spor při "mikrocyklové sporulaci" tedy ukazuje, že do celkové fáze vývoje se přičítají zřejmě i změny typické pro vegetativní buňky "makrocyklové sporulace" (sporulace po mnoha děleních), i když k jejímu rozdělení nedošlo. Tato skutečnost byla později mnoha zahraničními autory, kteří navázali na tuto práci, prokázána. Vytvořením zjednodušeného experimentálního modelu "mikrocyklové sporogenese" byl tak vytvořen předpoklad pro přímé studium tvorby prakticky důležitých metabolitů v relativně homogenním systému jednotlivých buněk. Zařazení jevu mikrocyklové sporogenese do celkového cytodiferenciačního cyklu bacilů je znázorněno na obr. 4, (Vaněk Z., Vinter V. 1977 : Mikrobna diferenciacija sporulacija i utvorenia metabolitiv. Mikrobiologičnij Žurnal (Kijev) XXXIX, str. 275-280). Ve schematu jsou uvedeny tyto procesy:

1 - Vyklíčení klidové spory,
2 - elongace vyklíčené spory (primární vegetativní buňka),
3 - dělení vegetativních buněk,
4 - sporulace buněk po několikanásobném rozdělení,
5 - uvolnění zralých spor ze sporangií,
6 - vytvoření sporangia z primární vegetativní buňky.

Při dalších podrobných studiích "mikrocyklové sporogenese" bylo důležité co nejpřesněji definovat stadium, ve kterém přenos vyklíčených spor ze živného do neživného media povede k maximálnímu výtěžku tvorby spor v primárních buňkách. K nejvyšší tvorbě "mikrocyklových sporangií" došlo tehdy, jestliže byly buňky přeneseny v průběhu první duplikace desoxyribonukleové kyseliny (Vinter V., Chaloupka J. 1967 : Differentiation of bacterial Cell

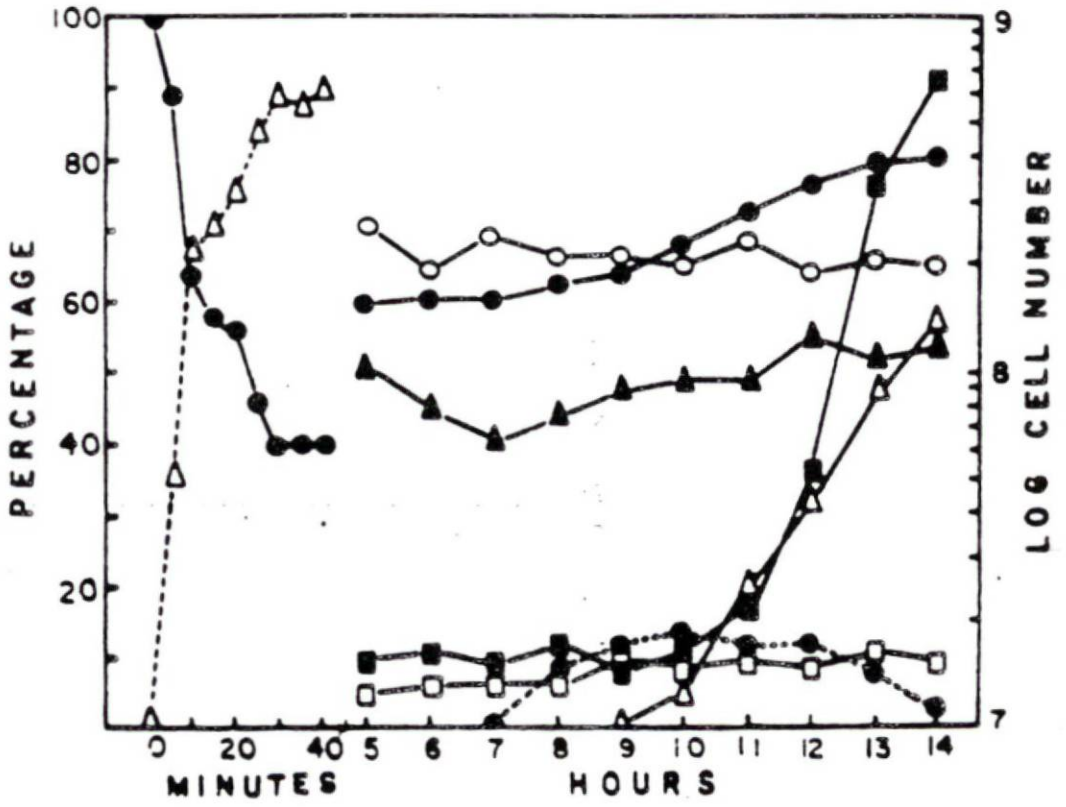
Causeed by the Changes in Nutrition. Acta Facult. Med. Univ. Brunensi 29 : 63-67). Závislost mikrocyklové sporogenese na zahájení syntézy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) potvrdili později též američtí autoři (Mychajlonka M. Slepecky R.A. 1974 : Requirement of Deoxyribonucleic Acid Synthesis for Microcycle Sporogenesis in Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 120 : 1331-1338). Buňky přenesené po první duplikaci DNA lysovaly, vyklíčené spory přenesené před botnáním se dále nevyvíjely, případně jen obnovily svou světlolomnost a vytvořily silnostěnné cystovité formy (Vinter V., Chaloupka J., Šťastná J., Čáslavská J. 1972 : Possibilities of Cellular Differentiation of Bacilli into Different Hypometabolic Forms (v knize "Spores V" /ed. H.O.Halvorson, R.Hanson, L.L.Campbell/, American Soc.Microbiol., str. 390-397).

Celkově představuje zkrácený cytodifferenciační cyklus mikrocyklové sporogenese nový biologický jev, využitelný při detailním biochemickém i genetickém studiu produkčních fází bacilární buňky v průmyslové výrobě, i při studiu etap vývoje jednotlivých typů odolnosti sporangií vůči chemickým a fysikálním inaktivačním faktorům. I když metody indukující mikrocyklovou sporogenesi nejsou metodami synchronizace kultury, je výhodou, že v tomto systému odpadají balastní biochemické procesy typické pro dělení buněk. Část kultury, která byla zastavena ve vývoji ve stadiu vyklíčených spor nebo silnostěnných "cystovitých" buněk, je biologicky inertní a neinterferuje tedy při určování morfologické a biochemické charakteristiky sporulujících primárních buněk. Bylo již uvedeno, že na předloženou prioritní práci o dosud neznámém jevu mikrocyklové sporogenese navázali ihned další vědci v zahraničních laboratořích, zabývající se problematikou sporulace bacilů. Již v roce 1966 se objevil první souhrn výsledků tohoto studia (Holmes P.K., Levinson H.S. 1966 : Microcycle Sporogenesis of Bacillus megaterium in Chemically Defined Media. Bacteriol.Proc., str. 16) a v dalších letech se řada jednotlivců a kolektivů studujících mikrocyklovou sporogenesi dále rozrostla. Tento jev byl opakovaně prokázán u Bacillus cereus a Bacillus megaterium, ale i u Bacillus subtilis a Bacillus brevis. Termín "mikrocyklová sporogenese" byl obecně přijat pro zástupce rodu Bacillus. Jev zkrácené cytodiferenciace však zaujal i mikrobiology pracující v jiných odvětvích. Termín mikrocyklové sporogenese byl přijat i pro další mikroorganismy a téměř ve všech pracích je citována předložená prioritní práce. Na studium mikrocyklové sporogenese navázali nejprve vědci v USA, později v SSSR, Anglii, Francii, Indii a Mexiku. Dnes je známo již značné množství prací o mikrocyklové sporogenesi dalších mikroorganismů : Azotobacter vinelandii, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces granaticolor, Aspergillus niger, Penicillium digitatum, Penicillium urticae, Neurospora crassa, Blastocladiella emersonii a Claviceps purpurea. Nelze již pořídit úplný seznam těchto desítek prací o mikrocyklové sporogenesi a z technických důvodů nelze také citace uvádět. U aspergillů a penicillií se ujal logicky název "mikrocyklová konidiace", nicméně první autoři, kteří u těchto vláknitých mikroorganismů tento název zavedli (Smith J. E. 1978 : Chapter 11. Asexual Sporulation in Filamentous Fungi. V knize "The Filamentous Fungi", Vol. 3, Developmental Mycology, /ed.J.E.Smith, D.R.Berry/, str. 214-239, Edward Arnold Publishers Ltd., Smith J. E., Anderson J. C., Kristiansen B., Al-Rowi A., Yahya A.G. 1981 : Microcycle conidiation. V knize "The Fungal

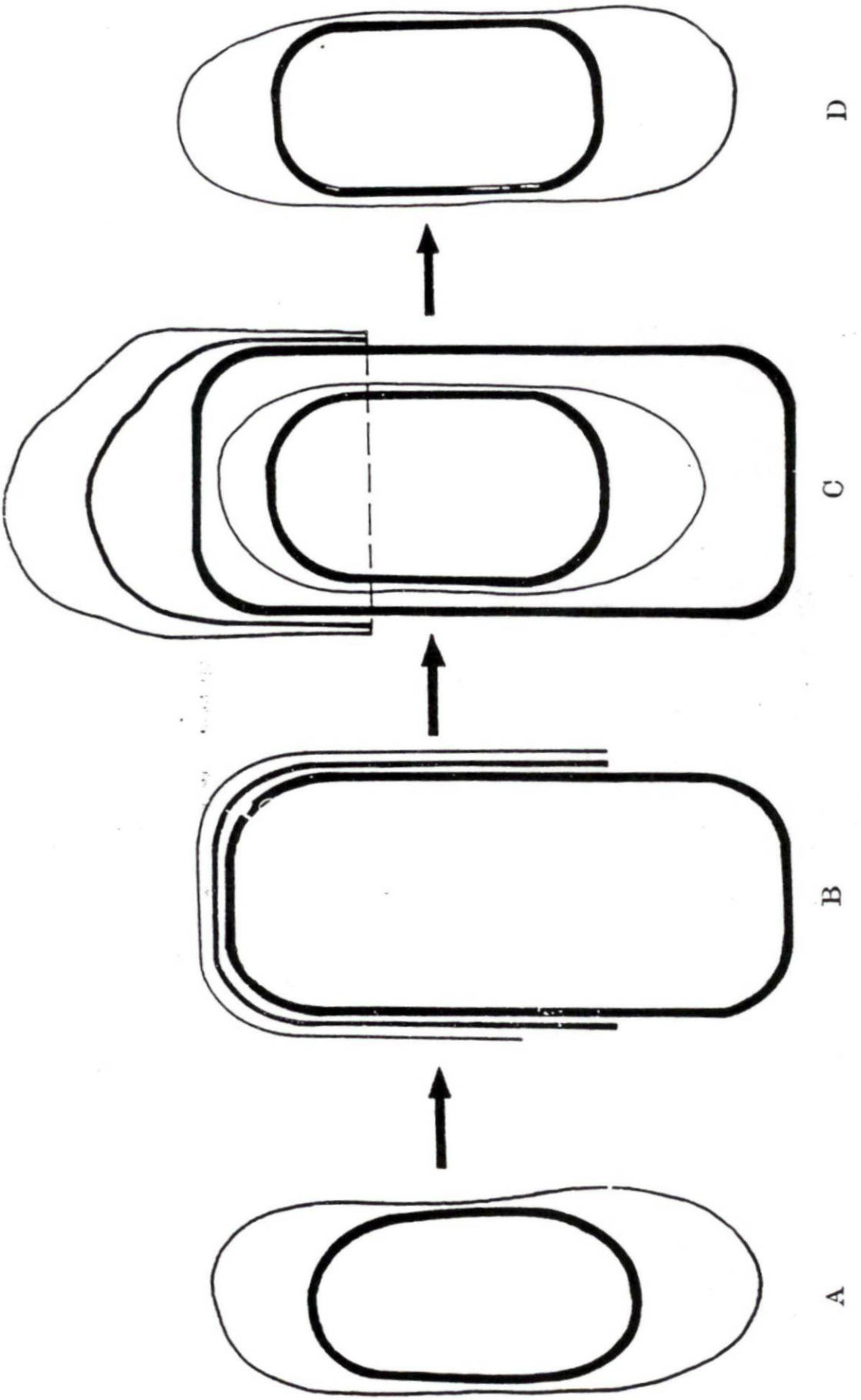
Spore : Morphogenetic Controls" /ed. Turian. G., Hohl H. G./, str. 627-650, Academic Press, New York), jednoznačně potvrdili podobnost tohoto jevu s cytodiferenciací bycilů a prioritní práci citovali. Jednotlivé skupiny autorů studovaly nejen teoretické aspekty mikrocyklové sporogenese, ale tento nový zkrácený model cytodiferenciace umožnil i studium tvorby prakticky důležitých metabolitů v jednotlivých fázích tohoto cyklu. Lze konstatovat, že jev zkrácené cytodiferenciace, spočívající v konversi klidové formy (spory, konidie, cysty) do primární buněčné formy (elongované primární buňky bakterií, primární hyfy) a dále za nutričního limitu opět do klidové, více nebo méně resistentní formy (spory, konidie, cysty), je obecným biologickým procesem. Je možno uvažovat, že za vhodných experimentálních podmínek je uskutečnitelný u všech mikroorganismů vytvářejících hypo-nebo ametabolické buněčné formy, určené k přežití druhu a/nebo k rozmnožování.

Vzniká otázka, zda jev mikrocyklové sporogenese, vyvolaný v laboratorních optimálních podmínkách v tekutém prostředí, může existovat v přírodě. Již v úvodu bylo zmíněno, že důvodem, proč bylo přistoupeno k pokusům s limitací živin u buněk v postgerminačním stadiu, byla snaha simulovat rychle se měnící nutriční podmínky v půdě, kde vyčerpání živin je zřejmě dominantním jevem. V této souvislosti lze uvést pokusy sovětských autorů (Gashinskij V.V., Voitsekhovskij V.G. 1977 : Heterogeneity of Microcyclic Development of Bacillus cereus 504. Mikrobiologičnyj Žurnal 22 : 353-354, Gashinskij V.V., Voitsekhovskij V.G. 1978 : Repeated Microcycle of Bacillus cereus. Mikrobiologija 47 : 373-375). Na pevných půdách v komůrkách prokázali u kmenů Bacillus cereus mikrocyklovou sporogenesi. Pokusy na pevných půdách se značně přiblížily podmínkám platným při existenci mikrobů na pevných částicích v půdě. Z oblasti výzkumu streptomycet se lze zmínit v této souvislosti o několikaletých studiích kolektivu profesora R.Locciho na katedře mykologie University v Udine v Italii, který porovnával rastrovacím elektronovým mikroskopem vývoj kultur na pevných laboratorních mediích a hlavně na půdních částicích. Došel k závěru, že vývoj aktinomycet za obou podmínek je stejný. Ze souhrnu jeho přednášky v Tokyu (Locci R. : 1988 : Comparative Morphology of Actinomycetes in Natural and Artificial Substrata, 7$^{th}$ International Symposium on Biology of Actinomycetes, Tokyo, Japonsko, Abstracts. str. 79) lze citovat jeho slova o vývoji aktinomycet v půdě : "When development takes place, streptomycetes usually show a "microcycle" type of growth, i. e. scarce vegetative development with immediate spore formation. The microcycle appears to be dependent on conditions approaching starvation, a situation reproducible on laboratory media, with carbon and nitrogen as limiting factors". Ve své přednášce profesor Locci dokonce zdůraznil (osobní sdělení RNDr. Z. Vaňka DrSc, MBÚ ČSAV, účastníka symposia), že cytodiferenciace typu mikrocyklové sporogenese (konidiace) zřejmě v přírodě převažuje, a že ke většímu pomnožení vegetativních forem mikroorganismů dochází méně často. I když tento závěr svědčí pro značný význam mikrocyklové sporogenese, je nutno poctivě čekat na další seriosní výsledky prací půdních mikrobiologů, získané se sporulujícími mikroorganismy v podmínkách vyskytujících se v přírodě.

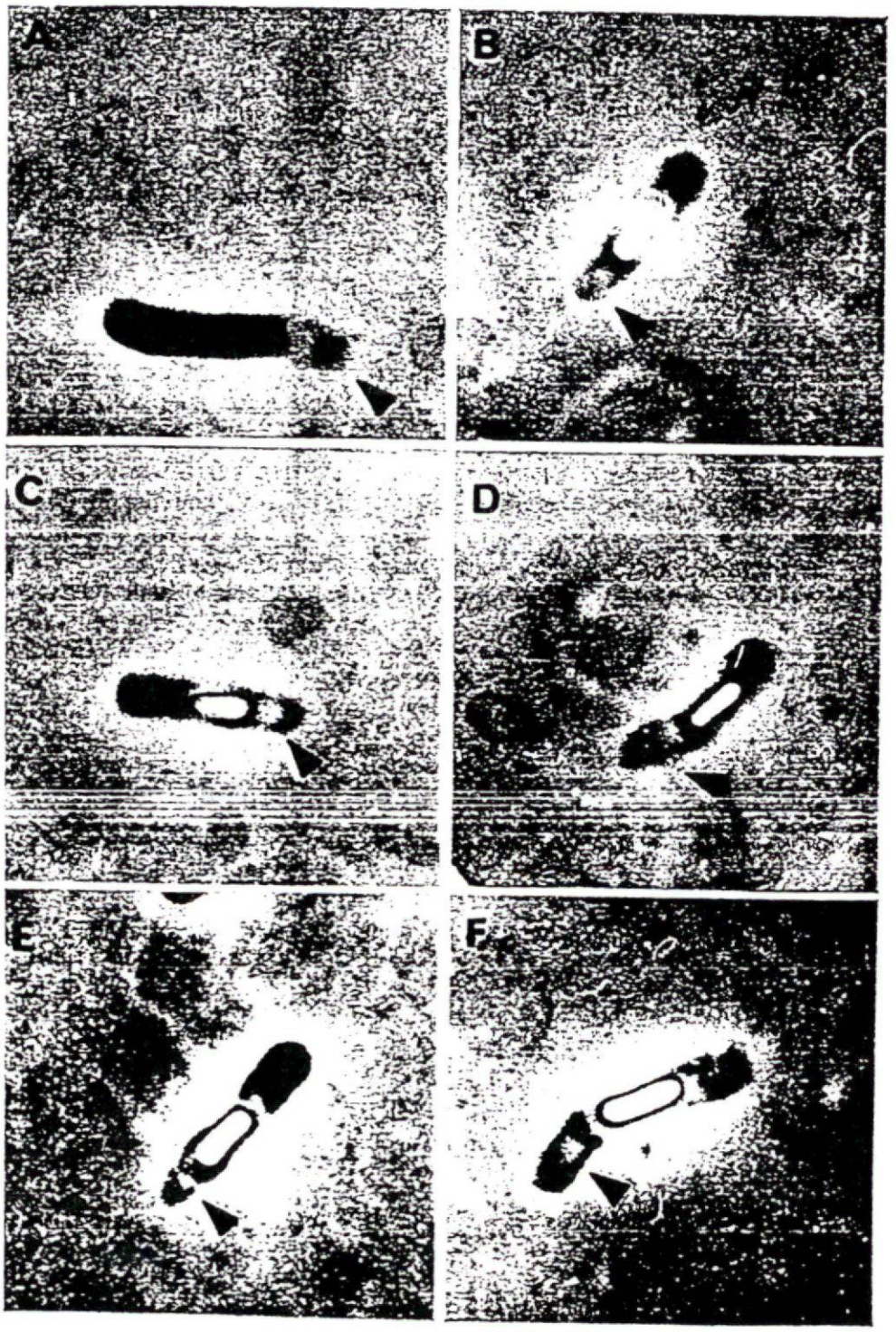
4 výkresy


100
80
60
40
20
PERCENTAGE
9
8
7
LOG CELL NUMBER
0
20
40
MINUTES
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
HOURS

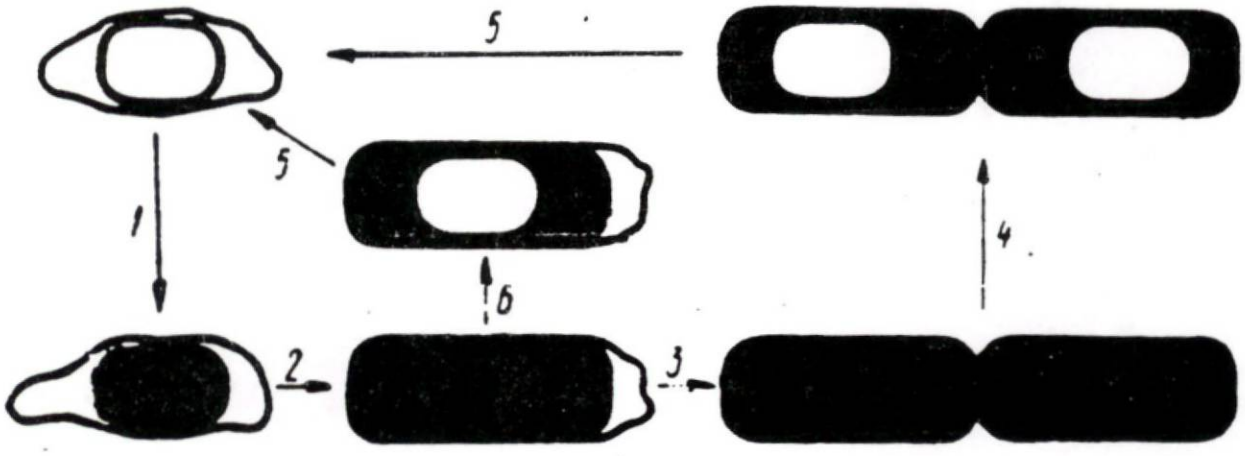
OBR.1




OBR.2




OBR.3




OBR. 4