

NAUČNO DRUŠTVO N. R. BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 6



SARAJEVO
1959

ERNEST I. GRIN

UPLIV ZEMLJE I NJEZINE MIKROPOPULACIJE NA PATOGENE DERMATOFITE U INFICIRANOJ DLACI

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 8-VII 1958 god.)

Zemlja predstavlja substrat u kojem žive mnogobrojni vrlo heterogeni organizmi koji se ne pojavljuju jednako u svakoj zemlji. Mikrobiološka populacija zemlje mijenja se prema svome sastavu. Zemlja koja sadrži bogate materije proteinom podržava intenzivni razvoj bakterija i aktinomiceta, dok materije bogate celulozom stimuliraju rast gljivica i bakterija koje su adaptirane na određene specifične procese, koji izgrađuju tu materiju (Waksman¹).

Razumljivo je da u takvom bogatom miljeu živih bića moraju da postoje izvjesni određeni međusobni odnosi koji se odražavaju u antagonizmu ili simbiozi postojeće mikropopulacije. Također se mora pretpostaviti da se analogni procesi uspostavljaju i u odnosu prema patogenim dermatofitima čovjeka ili životinje kada dospiju pod prirodnim uslovima, u patološkom materijalu koji parazitiraju (ročana substancija kože, dlake, nokti), u neposredni kontakt sa životnim sistemom zemljine sadržine.

Pojava antagonizma između dermatofita i izvjesnih drugih mikroorganizama poznata je duže vremena (Weidman, Chambers i Weidman²) i antibiotične tvari koje nastaju kao produkt njihovog metabolizma mogu djelovati na dermatofite modificirajući njihov rast, njihovu morfološku strukturu, fiziološke i druge osobine ili ih konačno potpuno razoriti (streptothricin, gliothoxin, hemipiocyanin i dr.).

S jedne strane postoje, dakle, u zemlji mikroorganizmi koji inhibiraju u većoj ili manjoj mjeri (pod laboratorijskim uslovima) rast patogenih dermatofita i drugih gljivica, o čemu govori i nedavno objavljeni rad Ettiga³, a s druge je strane opet utvrđeno da zemlja može da služi i kao obitavalište za izvjesne patogene gljivice (Emmons⁴, ⁵, Ajello⁶, ⁷, ⁸, Gordon⁹, Grin i Ožegović¹⁰, Frey i Durie¹¹ i dr.), koje u njoj vegetiraju kao saprofiti. Šta više Vanbreuseghem¹² je utvrdio da zemlja ima i stimulirajuće djelovanje na vitalnost patogenih dermatofita kada se doda podlogama da se spriječi pleomorfni rast kulture.

Sve to ukazuje da se ne mogu dermatofiti kao patogeni mikroorganizmi za čovjeka i životinju posmatrati izolirano, bez veze sa ekološkim faktorima koji na njih utiču, ako se želi da shvati njihova patogenetska i epidemiološka dinamika u cjelini.

Iz toga aspekta usmjerena su i istraživanja koja su ovdje iznesena. Na prvom mjestu tražen je odgovor na pitanje: što se događa sa patogenim dermatofitima koji su adaptirani na parazitarni život u keratinskoj substanci čovjeka kada dođu u dodir sa zemljom, kako se to događa pod prirodnim uslovima sa otpatcima patološkog materijala u predjelima seoskih uslova života, gdje se dermatomikoze pojavljuju u endemskom obliku.

Kao test upotrebljavali smo za ova ispitivanja parazitirane dlačice sa obojelog vlasišta trihofitije i favusa. Najčešće smo se služili dlačicama *T. violaceuma*.

U tim opitima vidjeli smo da parazitirane dlačice, stavljene u nesterilnu zemlju,*) zadržavaju svoju konturu dosta dugo vremena, ali da gljivični elementi u njoj postepeno gube svoju oštrinu, lome slabije svjetlo i čine više utisak »sjene« oblika gljivičnih elemenata (bez vitalnog sadržaja citoplazme) dok se konačno potpuno ne raspadnu (sl. br. 1). Prostor u dlaci, koji je bio prije ispunjen gljivičnim elementima, ispuni se zrakom (sl. br. 2), ali se brzo cijeli sadržaj pretvori u homogenu sitnu granuliranu masu.

Keratinska substanca dlake ostaje pošteđena na početku raspadanja gljivičnih elemenata u njoj i ona zadržava svoj primarni oblik i vanjsku strukturu. Moglo se često zapaziti kod parazitiranih dlačica *T. violaceuma*, u kojima su gljivični elementi u kontaktu sa zemljom već potpuno bili raspadnuti, da je cuticula dlake sa svojim karakterističnim smještajem ćelija u obliku crijepa ostala posve intaktna (sl. br. 3). Ako bi se za opis ovog stanja poslužili toliko puta citiranom i vrlo uspješnom uporedbom *Sabourauda* da dlaka trihofitije liči na vreću ispunjenu orasima, mogli bi reći da su pod uplivom zemlje i njene mikropopulacije orasi nestali i da je ostala samo prazna vreća.

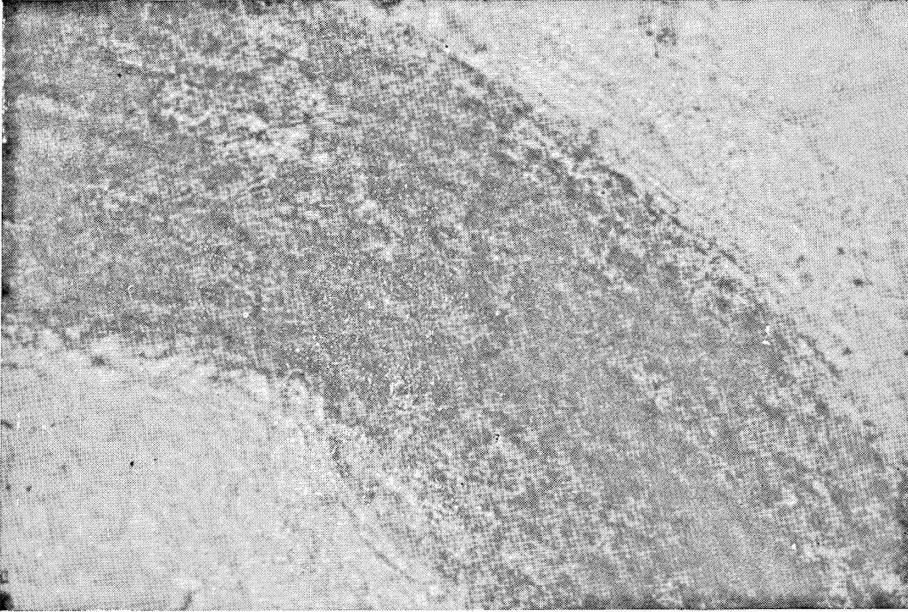
Taj proces raspadanja gljivičnih elemenata nije uvijek jednoličan i jednako intenzivan i ne odvija se uvijek u istom vremenskom razdoblju. Ponekad se i događalo da su parazitirane gljivice *T. violaceuma* prvih dana u zemlji u patološkom materijalu nastavile život u saprofitičnom obliku i da je dolazilo do rudimentarne germinacije spora, ali taj život je brzo prestao zbog nepovoljnih uslova antagonističke mikropopulacije koja se pojavljuje u zemlji.

Opisane promjene u parazitiranoj dlaci nastaju obično već za nekoliko dana i po pravilu pod odgovarajućim uslovima gubi se morfološka

*) Metodika: zemlja koju smo obrađivali prethodno je izmrvljena u tarioniku i stavljena u sterilnu petrijevu ploču. Količina zemlje je otprilike toliko koliko sadrži petrijeva ploča. Inficirane dlačice stavljali smo na površinu zemlje ili ih malo pokrili zemljom da budu s njom u što neposrednijem dodiru. Dlačice su prethodno mikroskopirane u sterilnoj destiliranoj vodi, da se utvrdi da li se radi o bolesnoj dlaci. Mjesto gdje su stavljene dlačice bilo je označeno tankim staklenim štapićima, da se lakše pronađu. Prije početka opita nakvašena je zemlja sterilnom destiliranom vodom, što je ponovljeno ako se zemlja u toku trajanja opita osušila.

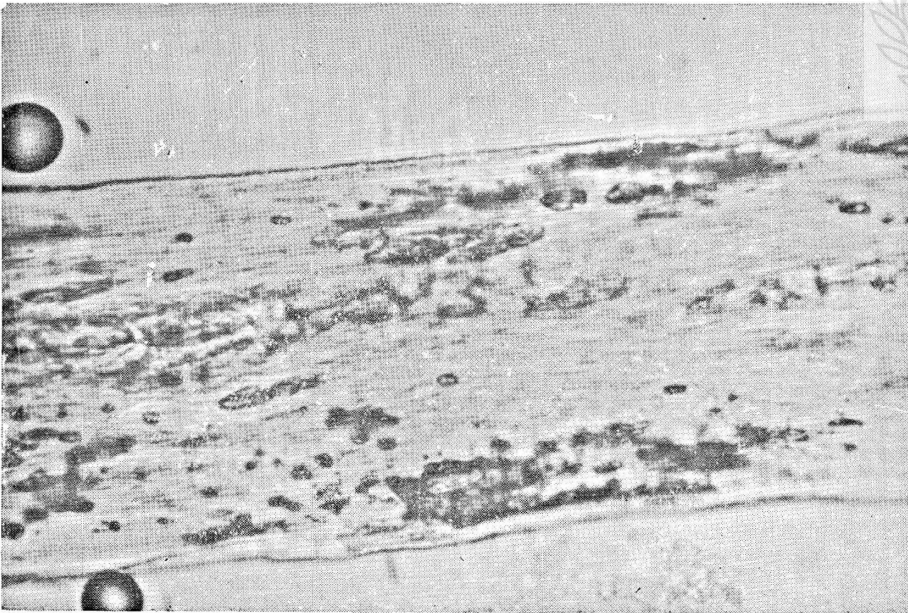
Kasnije smo radili sa manjom količinom zemlje u udubljenom predmetnom staklu, koje smo držali u vlažnoj komori.

Pri tehničkom radu ovih istraživanja neobično mnogo su pomogli savjesnim i preciznim radom zdravstveni tehničari mikološkog laboratorija Centralnog kožno-veneričnog dispanzera drugarica Zdenka Kolovrat i Rukija Juričić, na čemu im i na ovom mjestu izražavam priznanje i zahvalnost.



Slika 1

Dlaka trihofitije (*T. violaceum*) iz zemlje (z. br. 166) poslije 7 dana (320 ×). Nativni preparat u KOH.



Sl. 2

Dlaka trihofitije iz zemlje (z. br. 148) poslije 6 dana, ispunjena zrakom na mjestu raspadnutih spora (320 ×). Nativni preparat u KOH.



struktura gljivica u dlaci za 6—8 dana, a katkada i ranije. Rijetko je taj proces trajao duže vremena (kao na pr. kod niske temperature i do 20 dana). Međutim vitalnost gljivičnih elemenata gubi se prije nego što nastupe njihove morfološke promjene i kultura na Sabouraud-ovom maltoze gojilištu (uz dodatak antibiotika po L. Georg i saradnicima^{13, 14}) ostaje po pravilu negativna već poslije četiri dana kontakta sa zemljom.

Zapazili smo da proces razgrađivanja gljivičnih elemenata ne zavisi samo o vrsti zemlje i njenih fizikalno-kemijskih osebina i mikrobiološke populacije, nego da pod istim uslovima i u istoj zemlji proces raspadanja ne teče uvijek istim intenzitetom u svim parazitiranim dlačicama. Vjerovatno nisu svi faktori potpuno jednaki na svakom mjestu zemljišta, kao što postoje izvjesne razlike i u otpornosti gljivičnih elemenata, ali se te razlike očituju samo u pogledu potrebnog vremena za konačni ishod procesa, koji, prije ili kasnije, svagda nastupa. Ipak sasvim izuzetno, iz nama još nepoznatih razloga, upliv neke zemlje na parazitirane gljivične elemente u dlaci izostaje dulje vremena nego obično. Takav je slučaj bio sa zemljom (z. br. 27) iz jednog krtičnjaka. Dlačica T. tonsuransa, koja je stajala u toj zemlji, dala je pozitivnu kulturu još poslije treće nedjelje.

Važan faktor u tome zbivanju igra vlaga zemljišta. U parazitiranim dlakama trihofitije i favusa po pravilu već poslije nekoliko dana stajanja u nesterilnoj vlažnoj zemlji nastale su promjene gljivičnih elemenata i kultura na Sabouraud-ovoj podlozi je brzo postala negativna, dok u suhoj, nenakvašenoj zemlji (z. br. 22) to nije bio slučaj.

U ovim ispitivanjima vršeni su opiti sa 18 uzoraka zemlje raznog porijekla (vidi Tab. I), a sa jednom ili drugom zemljom vršeni su opiti i po nekoliko puta.

Tab. I

Laboratorijski broj zemlje	Porijeklo zemlje
24, 94, 142, 166, 179,	seosko dvorište
23, 153, 178, 210, 239,	vrt
160,	uz kokošinjac
102,	pored kuće
177,	obala rijeke
25, 27,	krtičnjak
148, 180,	pod pojate
22,	zemljani pod seoske sobe

Pored laboratorijskih ispitivanja izvršeni su također i eksperimenti pod prirodnim uslovima.*) Opiti su vršeni u slobodnom zemljištu rastresite ilovače i u šumskoj zemlji. U tu svrhu iskopana je sa određenog mjesta svježa zemlja kojom je napunjena do vrha posebno izradena staklena posudica veličine 2×4 cm, koja je perforirana na mnogim mjestima sa promjerom perforacije 2—3 mm da bi bio što neposredniji kontakt sa ostalom zemljom. Na gornji sloj zemlje u toj posudici stavljene su inficirane dlačice i posudica sa inficiranim materijalom vraćena u zemlju.

U jednoj skupini opita gornji rub staklene posudice ostao je na nivou okolnog zemljišta, a u drugoj ukopan do 2 cm ispod zemlje, gdje još postoji neposredan kontakt sa zrakom.

Mikroskopski nalaz parazitiranih dlačica *T. violaceuma* koje su služile kao najpodesniji test za ova ispitivanja nije se mnogo razlikovao od nalaza koji su utvrđeni pod laboratorijskim uslovima. Razgrađivanje gljivičnih elemenata u dlaci nastupa postepeno, često nejednolično, dok ne nastupi konačna totalna liza uz inače relativno dobro sačuvanu konturu i građu dlake. Nije postojala signifikantna razlika između stanja inficiranih dlačica, da li su stajale na površini ili su bile zakopane u zemlji. Mogle su se zapaziti jedino manje razlike u toliko što je proces razgrađivanja gljivičnih elemenata kod dlačica koje su bile ispod nivoa zemlje bio nešto intenzivniji u šumskom zemljištu, gdje je i saprofitična gljivična flora oko dlake bila bogatija. Obratno je zapaženo u zemljištu rastresite ilovače. Međutim izrazita je razlika postojala što se tiče potrebnog vremena za raspadanje spora u inficiranoj dlaci kada je vanjska temperatura, a time i temperatura zemljišta, bila niža. Tako je hladno jesenje vrijeme, kada su bili zadnji opiti izvršeni, znatno i očito usporavalo razgrađivanje parazitiranih gljivica, koje je u hladnim oktobarskim danima iziskivalo i do 20 dana. To je uostalom u skladu sa općom i fundamentalnom pojavom smanjene biološke funkcije kod niske temperature, kojoj podliježe i mikropopulacija zemlje.

Kod ocjene mikroskopskih promjena gljivičnih elemenata u inficiranim dlačicama bilo je mnogo teže dati određene nalaze kod *T. schoenleini* nego kod *T. violaceuma*, jer je često bilo gotovo nemoguće razlikovati kod *T. schoenleini* da li se radi o morfološkim promjenama onih gljivičnih elemenata koji su još bili vitalni prije kontakta sa zemljom ili samo o residualnim promjenama micelskih vlakana koje su postojale i ranije. Imali smo utisak da se kod inficiranih dlačica sa *T. schoenleini* prvo artrospore i micelska vlakanca deformišu sužavanjem ili mjestimičnim proširenjem, a zatim da se raspadaju u zrnastu masu. U nekim slučajevima bilo je teško diferencirati da li međusobno isprepletana micelska vlakanca, koja poslije izvjesnog vremena opkoljavaju parazitirane dlačice u zemlji, pripadaju saprofitičnoj gljivičnoj flori okoline ili potječu od primarnih parazita *favusa*. Negativna kultura na Sabouraud-ovom gojilištu (sa antibioticima) redovno je potvrđivala pretpostavku da se radilo o saprofitičnim gljivicama.

*) U ovim ispitivanjima pružio je znatnu tehničku pomoć svojim preciznim radom abs. med. drug Nusret Velić, te mu se i na ovom mjestu posebno zahvaljujem.

Mnogo podesniji materijal za testiranje bile su dlačice *T. violaceuma*, jer su se promjene na sporama koje ispunjavaju inficiranu dlačicu mnogo lakše i pouzdanije mogle da uoče i ocjene, zato smo se i u našim kasnijim opitima pretežno služili tim materijalom.

Poznato je (Winogradsky¹⁵, Imšenecki¹⁶ i dr.) da mikropopulacija zemlje pored mnogih drugih mikroorganizama sadrži bakterije i gljivice koje biokemijskom oksidacijom rastvaraju celulozu i njoj slične organske materije. Radi se na prvom mjestu o tako zvanim celuloznim bakterijama aerobne skupine i o saprofitičnim gljivicama, koje razgrađuju celulozu prvenstveno u šumskom zemljištu (aktinomicete to čine po Waksmanu¹ pretežno u suhom tlu, gdje prve dvije skupine ne mogu potpuno ispoljiti svoju aktivnost). Proces razgrađivanja celuloze spada u osnovne biološke pojave u zemlji koje omogućavaju kontinuitet životnog ciklusa u prirodi. Pod pretpostavkom da se takvi ili slični biokemijski procesi moguće odigravaju i prilikom raspadanja gljivičnih elemenata patogenih dermatofita u parazitiranoj dlaci kada dođu u kontakt sa zemljom i njenom mikropopulacijom (budući da celuloza i njoj slični kemijski spojevi čine važni sastavni dio građe gljivica¹⁷), izvršeno je u tom smislu niz eksperimenata.

Na prvom mjestu željeli smo da sa parazitiranim dlačicama, koje su stajale izvjesno vrijeme u nesterilnoj zemlji i u kojima je već nastupio proces raspadanja gljivičnih elemenata, izoliramo mikroorganizme koji moguće spadaju u skupinu razgrađivača celuloznih materija. To smo učinili sa dlačicama *T. violaceuma*, koje su stajale u nesterilnoj vlažnoj zemlji (z. br. 239) nekoliko dana (9, 12 i 24 dana). Dlačice izvađene iz zemlje saprali smo u sterilnoj destiliranoj vodi, zatim smrvili u sitnu kašu i presadili na podlogu čistog agara sa filter-papirom. Ovu podlogu preporuča Imšenecki¹⁶ kao podesnu za rast celuloznih mikroorganizama i ona se i u našem radu (na mjesto siliko-žela) pokazala kao jednostavna i dobra*).

Iz materijala dlake *T. violaceuma* (koja na Sabouraud-ovoj podlozi sa antibioticima po L. Georg¹⁴ nije više dala pozitivnu kulturu primarnih patogenih dermatofita) izolirano je na agaru sa filter-papirom više različitih kolonija mikroorganizama, koje su dosta intenzivno rastvarale celulozu filter-papira na podlozi agara (sl. br. 4).

Poznata je činjenica da postoje znatne poteškoće da se izdvoje i diferenciraju bakterijske mješavine koje se razmnožavaju u sredini koja sadrži celulozu, ali to i nije bio cilj u ovim opitima nego samo da se utvrdi da li mikroorganizmi koji su izolirani uopće razgrađuju gljivične elemente. Zato i nismo išli za tim da ih sa sigurnošću determiniramo. Mikroorganizmi koje smo izolirali odgovaraju, po svom izgledu kulture

*) Metodika: pripremi se podloga od 2% agara (koji se prethodno pod tekućom vodom dobro izapire 24 sata), i razlije u petrijeve šalice. Filter-papir izrezan u obliku kruga veličine petrijeve šalice sterilise se i stavi na pripremljeni sterilni agar i prelije hranljivim rastvorom (5—8 ccm), koji se prije toga prokuha. Kada je filter-papir potpuno upio ovaj rastvor, podloga se može upotrebiti.

Rastvor se priprema od standardne solucije (KH₂PO₄ — 1,0; MgSO₄ — 0,5; FeSO₄ — 0,01; MNSO₄ — 0,01; destil. voda — 200,0) na taj način što se 20 gr standardne solucije doda rastvoru slijedećeg sastava: CaCO₃ : 0,2; KNO₃ : 0,3; destil. vode : 100,0; k tome se doda još 2% potaše (ca 60 kapi) do PH 7,2.

i mikroskopskoj morfologiji, celuloznim bakterijama koje Winogradsky¹⁵ svrstava u rod *cellfasciula* odnosno *celvibria*. Iz dlake trihofitije koja je stajala u zemlji (br. 239) dobili smo dvije kulture (br. 239/1 i br. 239/2). Jedna je rasla prljavo-žuto-krem boje (štapici vretenastog oblika sa kromatičnim zrnem u sredini), koje Winogradsky¹⁵ svrstava u *cellfasciule*, a druga žute boje (dugački tanki štapici, malo deblji u sredini) koja bi odgovarala celuloznim mikroorganizmima skupine *cellvibria*. Kod ponovnog zasađivanja skoro uvijek su se pojavljivali isti biotipi.

Što se tiče fiziološke klasifikacije (Waksman¹) mikroorganizama koji razgrađuju dermatofite u zemlji, oni spadaju vrlo vjerovatno u skupinu heterotrofičnih, čiji je razvoj vezan za organsku materiju kao izvor energije (primarno za dekompoziciju celuloze, zatim ugljičnih hidrata, proteina i drugih nitrogenih materija).

Kada smo stavili parazitiranu dlaku *T. violaceuma* na kulturu izoliranih celuloznih bakterija, vidjeli smo nakon nekoliko dana da one stvaraju oko dlačice plašt mikroorganizama koji prodiru i u unutrašnjost same dlake, a spore u dlaci gube postepeno jasnoću konture i raspadaju se (sl. br. 5), iako znatno sporije i manje potpuno nego li u samoj zemlji; a u tome substratu vjerovatno djeluje istovremeno ili sukcesivno više raznih faktora nego li u navedenom laboratorijskom eksperimentu.

Analogne opite izvršili smo i sa kulturama koje smo izolirali iz zemlje (br. 160). One su manje ili više razgrađivale vlakanca filter-papira i gljivične elemente u inficiranoj dlaci *T. violaceuma*. Najintenzivnije su djelovale kolonije, koje po izgledu kulture i mikroskopskoj slici odgovaraju *cytophagima* Hutchinson (sluzavo žute mrlje, koje se sastoje od dugih, tankih i zašiljenih filamenata združenih sa okruglim tjelešcima u obliku koka). Međutim i u ovom opitu kulture nisu djelovale na gljivične parazite u inficiranoj dlaci tako intenzivno, kao kada su stavljene u nesterilnu zemlju. To se je manifestovalo i u tome što smo dobili pozitivnu kulturu primarnih patogenih dermatofita još poslije sedam dana neposrednog kontakta sa tim bakterijama.

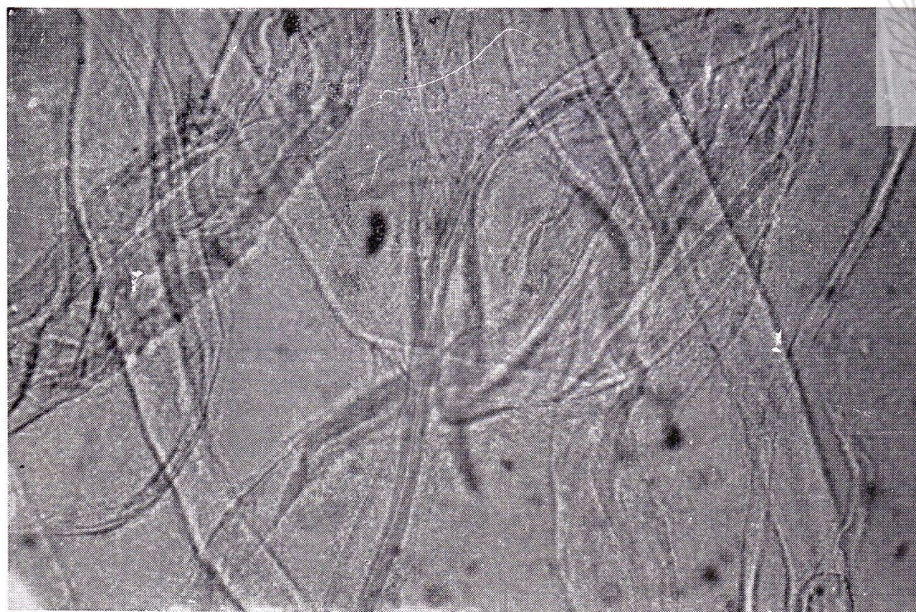
Pored ispitivanja mikroorganizama na specifičnim podlogama koje rastvaraju celulozu, ispitivali smo u jednoj skupini eksperimenata izolirane mikroorganizme (z. br. 160) na običnom agaru. Izolirano je 8 raznih sojeva bakterija koji su dobiveni neposredno iz zemlje. U ovoj fazi ispitivanja nije se išlo ni ovdje za tim da se i determiniraju svi mikroorganizmi, koji su izolirani iz zemlje, nego da se primarno utvrdi njihovo djelovanje na patogene dermatofite u parazitarnom životu kao fundamentalnoj biološkoj pojavi u prirodi. Zato smo izolirane mikroorganizme kojima smo eksperimentisali označavali laboratorijskim oznakama i utvrdili smo njihovu morfologiju i diferencijaciju po Gramu.

Od izraslih kultura napravljena je suspenzija sa sterilnom fiziološkom otopinom NaCl i nekoliko kapljica takve suspenzije stavljeno u udubljeno predmetno staklo u kojem su položene parazitirane dlačice trihofitije (*T. violaceum*). Preparati su zatim stavljani u vlažnu komoru i ostavljeni pri sobnoj temperaturi. Od šest ispitanih sojeva, s obzirom na njihovo lizirajuće djelovanje na gljivične elemente u dlaci, pet sojeva (z. br. 160 — s. br. I, II, III, VII i VIII) je pokazivalo takvo svojstvo (sl. br. 6). Nakon 6—8 dana gljivični elementi u inficiranoj dlaci bili su ili kompletno lizirani ili su se samo još djelomično nazirale



Sl. 3

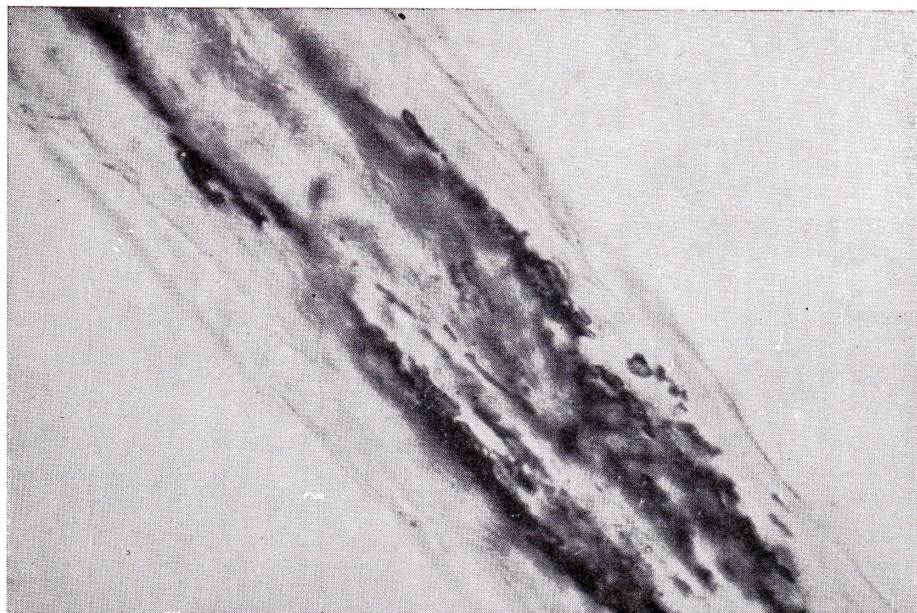
Cuticula dlake trihotifije ($320\times$) sačuvana nakon 10 dana stajanja u zemlji (z. br. 180). Nativni preparat u KOH.



Sl. 4

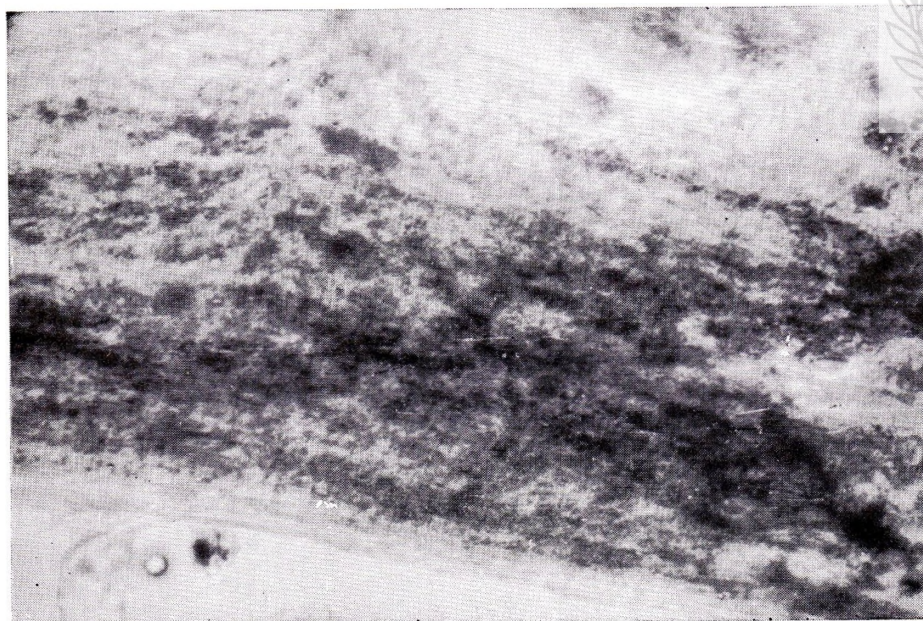
Rastvaranje vlakanca filter papira djelovanjem celuloznih bakterija ($320\times$). Nativni preparat u KOH.





Sl. 5

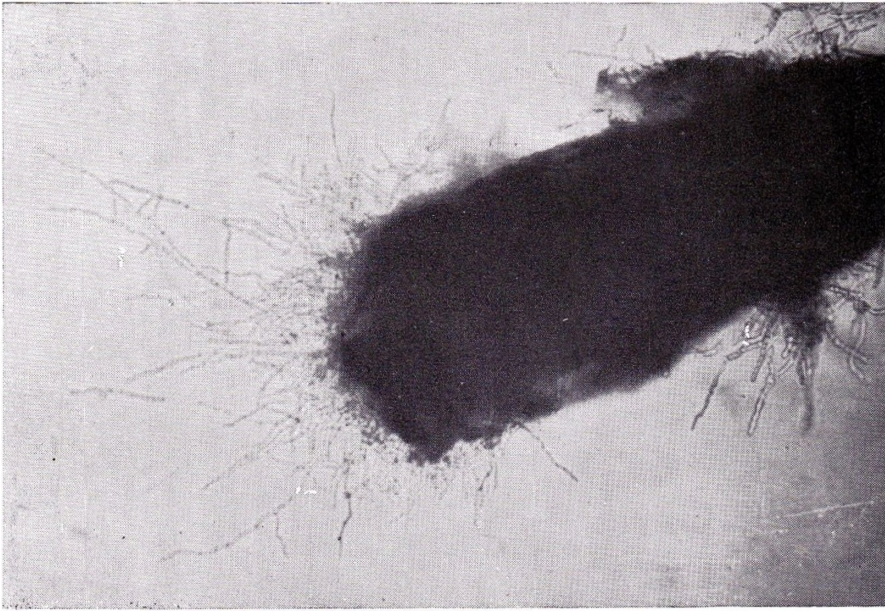
Dlaka trihofitije u kontaktu sa celuloznim bakterijama (z. br. 160/1) poslije sedam dana ($320\times$). Nativni preparat u KOH.



Sl. 6

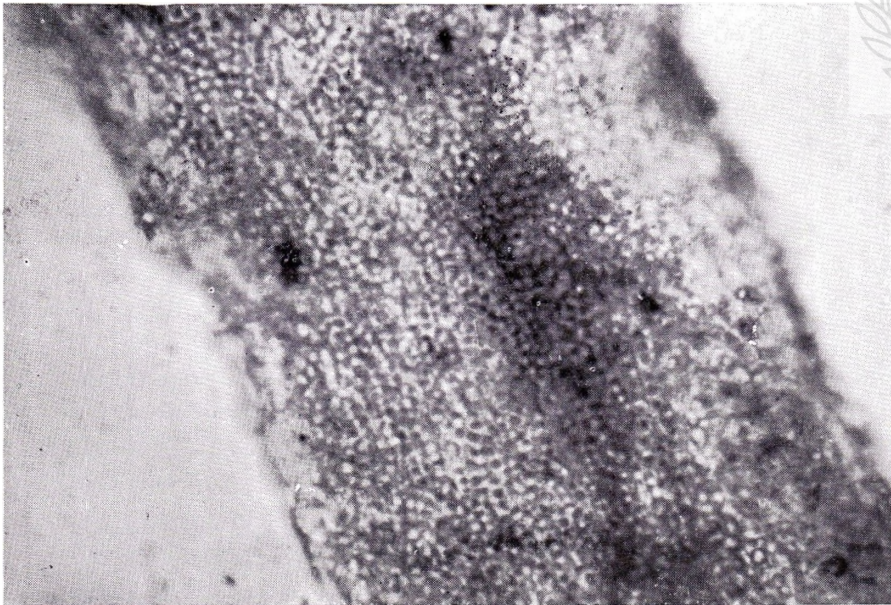
Dlaka trihofitije u suspenziji bakterija (Z. br. 160/II). Nakon pet dana nastupila je liza gljivičnih elemenata ($320\times$). Nativni preprat u KOH.





Sl. 7

Dlake trihofitije u suspenziji bakterija (Z. br. 160/IV) sa germinacijom gljivičnih elemenata. Postoji simboza (320 ×). Nativni preparat u KOH.
gljivičnih elemenata. Postoji simbioza (320 ×). Nativni preparat u KOH.



Sl. 8

Izgled dlake *T. violaceum* sterilizirane u autoklavu (320 ×).
Nativni preparat u KOH.



nejasne konture spora. Samo jedan soj (z. br. 160 — s. br. IV) nije imao takvo djelovanje, šta više postojali su očiti znaci simbioze i parazitirani gljivični elementi pokazivali su vrlo bogatu germinaciju spora (sl. br. 7).

Dosta je očito da je opisani proces raspadanja gljivičnih elemenata u parazitiranoj dlaci vezan za neposrednu biološku funkciju živih mikroorganizama, i u steriliziranoj emulziji istih mikroorganizama izostalo je takvo djelovanje. Šta više sterilizirana emulzija pokazala se redovno kao podesna podloga za razvoj i proliferaciju dermatofita iz parazitirane dlake.

Zanimljiva su nadalje zapažanja sa tim sojevima kako djeluju u čistoj kulturi na parazite u inficiranoj dlaci *T. violaceuma*, vraćeni u svoj primarni substrat. U tu svrhu stavili smo parazitirane dlačice na nesterilnu zemlju (z. br. 210) u šest petrijevih šalica i prelili svaku sa jednom od suspenzija izolovanih kultura (z. br. 160 — s. br. I, II, III, IV, VII, VIII). Analogno smo učinili i sa steriliziranom zemljom (na 120 stepeni 2 sata). Kao kontrolni test stavili smo parazitirane dlačice u steriliziranu zemlju i prelili je sterilnom destiliranom vodom. U ovom eksperimentu promjene su observirane u toku osam dana.

Na prvom mjestu moglo se utvrditi da postoji dosta očita razlika između promjena u steriliziranoj i nesterilnoj zemlji. Gljivični elementi u dlačicama koje su stavljene na steriliziranu zemlju i prelivene jednom od suspenzija kulture pokazivali su u glavnom znatno sporiji proces raspadanja nego li u nesterilnoj zemlji, a kod nekih dlačica nastupila je u prva 2—3 dana i dosta živa germinacija spora, (naročito u zemlji prelivenom sa suspenzijom s. br. I) i tek kasnije nastupila je potpuna ili djelomična liza gljivičnih elemenata (s. br. II i IV). Oko parazitirane dlake razvio se obično omotač mikroorganizama i proces raspadanja išao je po pravilu od medularnog djela dlake prema perifernom. Imao se utisak kao da se mikroorganizmi prilagođuju strukturi dlake.

Razgrađivanje gljivičnih elemenata u prirodi vjerovatno se i ne događa djelovanjem samo jedne vrste mikroorganizama nego se taj proces odvija po svoj prilici simbiotičnim djelovanjem više vrsta mikroorganizama, te se može pretpostaviti da je to i razlog zbog čega su zapažene razlike u steriliziranoj i nesterilnoj zemlji.

U nesterilnoj zemlji proces raspadanja gljivičnih elemenata u parazitiranim dlakama koje su bile prelivene jednom od suspenzije kulture (s. br. I, II, III, IV i VIII) bio je potpun u toku osam dana, a u zemlji samo sa suspenzijom s. br. VII taj proces u istom vremenskom razdoblju razvio se samo djelomično.

Upoređujući rezultate koje smo dobili sa suspenzijom mikroorganizama u fiziološkoj otopini soli u njihovom primarnom substratu (zemlji, odakle su izolirani) uz djelovanje ostale mikropopulacije u njoj i bez nje (to jest u steriliziranoj zemlji), vidimo da postoje u tom pogledu izvjesne razlike. U nesterilnoj zemlji uz autohtonu mikropopulaciju proces raspadanja spora, odvijao se manje više kao u običnoj nesterilnoj zemlji, osim u zemlji sa suspenzijom kulture s. br. VII gdje je bio očito usporen (vjerovatno da je tu bila u pitanju poremećena ravnoteža međusobnih bioloških odnosa mikropopulacije zbog nastale hipertrofije jedne vrste mikroorganizama). S druge strane kod mikroorganizama koji u čistoj suspenziji nisu pokazivali uopće lizirajuće

djelovanje na gljivične elemente (s. br. IV), nego su čak stimulirali njihovu germinaciju, postojalo je takvo djelovanje u njihovom primarnom substratu — zemlji i to, ne samo u nesterilnoj, gdje postoji kompleksno djelovanje raznolikih mikroorganizama, nego i u steriliziranoj zemlji, iako u manjem intenzitetu.

U kontrolnoj nesterilnoj zemlji odvijao se proces raspadanja gljivičnih elemenata kako je to obično zapaženo pod laboratorijskim uslovima i kako je već opisano. Međutim mnogo zanimljiviji i značajniji rezultati pokazali su se u kontrolnom testu u steriliziranoj zemlji (120 stepeni Cel. — 2 sata). U prvim danima ostale su spore u dlaci koja je stavljena u steriliziranu zemlju dobro sačuvane, ali već nekoliko dana kasnije nastupilo je i ovdje njihovo raspadanje. To se naročito očitovalo kada su se oko dlake pojavile veće skupine mikroorganizama koje su konačno opkolile cijelu dlaku. Tada se po pravilu i spore nisu više primjećivale u parazitiranoj dlaci. Logično je da pretpostavimo, s obzirom da se radilo o parazitiranim dlakama u sterilnom substratu (sterilizirana zemlja prelivena sterilnom destiliranom vodom), da su u pitanju mikroorganizmi koji potječu od autohtone saprofitične flore koja je postojala na patološkom materijalu još prije nego je stavljen u sterilnu zemlju, i mikroorganizmi, koji su se u tim uslovima mogli da razmnože, djelovali su razorno na gljivične parazite u dlaci. O toj pojavi, koja izgleda da bi mogla biti od važnosti i za samu patogenezu gljivične infekcije, biće još kasnije izneseno više podataka.

U daljim istraživanjima o agensima koji dolaze u obzir za razgrađivanje patogenih dermatofita u parazitiranoj dlaci u zemlji izvršeni su i opiti koji bi moguće mogli da odgovore i na pitanje da li se ti agensi nalaze u zemlji kao produkti metabolizma zemljine mikropopulacije, da li se radi o kemijsko-fizičkim osebina samoga substrata, ili se radi, kako do sada navedeni rezultati upućuju, o neposrednoj biokemijskoj funkciji izvjesnih mikroorganizama, koji (vjerovatno putem djelovanja enzima) razgrađuju organsku materiju dermatofita.

U tome pogledu ispitano je osam raznih primjeraka zemlje (z. br. 153, 160, 166, 177, 178, 179, 180 i 210), od kojih su pripremljeni ekstrakti u alkoholu, eteru, destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini NaCl da se vidi kako djeluju na gljivične elemente u parazitiranoj dlaci.*)

U ekstraktima alkohola i etera gljivični elementi su ostali nepromjenjeni i poslije 13 dana. Oni su zadržali potpuno nepromjenjenu morfološku strukturu, ali kulture na Sabouraud-ovom maltoze gojilištu kako testiranih tako i kontrolnih dlačica ostale su negativne.

Drugačije je bilo u ekstraktima destilirane vode i fiziološke otopine soli. Tu su gljivični elementi u parazitiranim dlačicama pokazivali analogne promjene kao i u nesterilnoj zemlji, tek što je proces raspadanja bio usporen u nekim opitima i do 18 dana do potpune lize. U tom opitu moglo se po pravilu vidjeti oko testiranih dlačica već nakon nekoliko dana vrlo obilna saprofitična mikroflora (sa pretežno saprofitičnim

*) Metodika: 5 gr zemlje stavljeno je u 15 ccm tečnosti a) 75% alkohola; b) etera; c) sterilne destilirane vode i d) sterilne fiziološke otopine kuhinjske soli). Mješavina se dobro promućka i ostavi 24 sata da stoji. Nakon taloženja zemlje ispipetira se gornji sloj tečnosti i u nju stave parazitirane dlačice. Kontrolne dlačice stavljene su u čiste tečnosti.

gljivicama), a sama, inače dobro sačuvana, dlačica zadržavala je manje ili više homogenu granuliranu masu u kojoj se nisu više razabirali morfološki elementi parazitiranih primarnih gljivica. I ovdje, kao i u nesterilnoj zemlji, proces raspadanja dermatofita u dlaci nije bio uvijek jednoličan. U takvim slučajevima oni dijelovi parazitirane dlačice, koji su još bili opkoljeni preostalim skvamama sa vlasišta, zadržali su duže vremena morfološke elemente parazita, kao da su skvame u izvjesnom stepenu štatile neposredno djelovanje saprofitičnih mikroorganizama.

Da se radi o neposrednom biokemijskom djelovanju živih mikroorganizama koji rastvaraju gljivične elemente u inficiranoj dlaci, govore i rezultati opita koji smo izvršili sa ekstraktom zemlje u destiliranoj vodi (z. br. 153) kada je filtriran kroz Seitzov filter. Parazitirane dlačice trihofitije (*T. violaceum*) u takvoj sredini zadržale su dobro sačuvane morfološke elemente gljivica i do 20 dana i tek kasnije, kada je došlo do onečišćenja miljea banalnim saprofitičnim mikroorganizmima, nastupile su postepeno promjene analogno gore opisanim.

Rezultati eksperimenata koji su izneseni dovoljno su karakteristični i stalni, da se može pretpostaviti da mikroorganizmi (koji izgleda da su specifične prirode) koji razgrađuju gljivične parazite u dlaci djeluju na njih samo u neposrednom kontaktu metabolizmom upućenim na degradaciju materije patogenih dermatofita, vjerovatno pomoću izvjesnih (fungilitičnih) fermenta, čija aktivnost zavisi od substrata, temperature i drugih faktora okoline.

Sasvim je drugačiji mehanizam djelovanja na parazitiranu dlaku keratinofilske saprofitične mikropopulacije zemlje, koja putem preteolitičnih enzima rastvara keratinsku substancu (Stahl¹⁸) sa svojim pretstavnikom *M. gypseum*, što će biti izneseno na drugome mjestu (Grin i Ožegović²⁰).

Kada su već bila završena ova ispitivanja, upoznali smo se sa vrlo zanimljivim i značajnim radom kand. bioloških nauka Z. G. Stepaniščeva¹⁹ iz Centralnog kožno-vener. instituta u Moskvi, koji također obrađuje sudbinu patogenih dermatofita stavljenih u zemlju sa patološkim materijalom u kojem parazitiraju. Stepaniščeva je ispitivala veći broj patogenih dermatofita od oboljelih ljudi i životinja (među kojima nije i *T. violaceum* koji smo mi najčešće testirali) i zaključak, do kojega je došla na osnovu rezultata inokuliranih zamoraca sa patološkim materijalom koji je stajao izvjesno vrijeme u zemlji, da zemlja ima »sterilizirajuće« svojstvo s obzirom na dermatofite, podudara se u osnovi sa našim rezultatima. Stepaniščeva se zadržala samo na inokulacijama na zamorcima i nije ulazila u mikroskopsku analizu promjena patološkog materijala niti u mikrobiološku analizu substrata i njihovog međusobnog odnosa — što je bio glavni predmet ovih ispitivanja — i služila se drugom metodikom, ali fakat, da su osnovna zapažanja u pogledu upliva zemlje (sterilne i nesterilne) na virulentnost izvjesnih patogenih dermatofita u biti jednaka, potvrđuje da se nesumnjivo radi o općoj i fundamentalnoj pojavi u prirodi.

Drugo je pitanje da li ova pojava isključuje postojanje patogenih dermatofita u slobodnoj prirodi, primarno u zemlji. Sigurno je da niz gljivica koje su patogene za čovjeka ili životinju mogu vegetirati kao saprofiti u zemlji (Emmons⁴, ⁵, Ajello⁶, ⁷, ⁸, i dr.), ali od patogenih dermatofita do sada je to sa sigurnošću utvrđeno samo za *M. gypseum* (Ajello⁶, ⁷, ⁸, Gordon⁹, Grin i Ožegović¹⁰ i dr.) i *T. mentagrophytes* (Vanbreuseghem²⁰). Svi pokušaji da se izoliraju iz zemlje one vrste dermatofita koji su već potpuno adaptirani na parazitarni život čovjeka, kao naprimjer *T. violaceum* i *T. schoenleini*, ostali su bezuspješni, iako je uspjelo da se sa raznih neživih substrata izoliraju neki dermatofiti (*Epiderm. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum*).

Međutim u ocjeni upliva zemlje na patogene dermatofite mora se imati u vidu, u vezi sa iznesenim rezultatima, da se tu radi o gljivicama koje se nalaze u parazitarnom životu u patološkom materijalu i da ne moraju biti njihovi odnosi prema mikropopulaciji zemlje jednaki kao kad vegetiraju kao saprofiti u njoj. To je utvrđeno za *M. gypseum* (Grin i Ožegović¹⁰) i ne bi bila isključena mogućnost da postoje analogni odnosi i kod nekih drugih patogenih dermatofita. Na osnovu naših dosadašnjih epidemioloških zapažanja i eksperimenata sa čistim kulturama u nesterilnoj zemlji vrlo je malo vjerovatno da potpuno prilagođene vrste dermatofita na parazitizam u humanom keratinskom substratu imaju sposobnost da se pojavljuju i održe kao saprofiti u zemlji kao svom prirodnom obitavalištu, kao što je slučaj za neke druge patogene gljivice (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Allesheria boydii*). Kada govorimo o prirodnom obitavalištu patogenih dermatofita u zemlji kao rezervoaru parazita, treba razlikovati da li oni mogu samo da prežive u određenim povoljnim uslovima izvjesno vrijeme u patološkom materijalu (kao na primjer laboratorijski čuvani materijal ili odbačeni patološki materijal sa oboljelog čovjeka ili životinje koji se zadržava na raznim substratima okoline) ili imaju sposobnost vegetacije u zemlji kao saprofiti. U tome pogledu značajna su opća zapažanja Garretta²¹ da sposobnost saprofitičnog razvoja jedne određene vrste gljivica stoji često u obrnutom donosu prema njezinoj parazitarnoj specifičnosti kao genetski determinirane karakteristike. Zato su na primjer *T. violaceum* i slični patogeni dermatofiti, koji su već stekli, može se reći, punu parazitarnu i genetski determiniranu specifičnost za humani organizam, lako mogli izgubiti sposobnost samostalnog saprofitičnog života u zemlji. To potvrđuju i rezultati dosadašnjih ispitivanja.

Posebna skupina opita odnosila se na stanje parazitirane dlake u steriliziranoj zemlji, jer smo zapazili da se i u sterilnom vlažnom miljeu pojavljuje pod izvjesnim uslovima raspadanje gljivičnih elemenata u parazitarnoj dlaci.

Na zemlju koja je u petrijevoj šalici sterilizirana vrućim zrakom na 120 stepeni Cel. dva sata (dva puta) i nakvašena sterilnom destiliranom vodom stavili smo dlačice *T. violaceuma* i ostavili pri sobnoj temperaturi. Ispitali smo u tome pogledu šest uzoraka zemljišta (z. br. 94, 102, 160, 166, 210, 239).

Općenito se može reći da je raspadanje spora u parazitiranoj dlaci nastupalo i u steriliziranoj zemlji po pravilu sporije, nego li u nesterilnoj zemlji, iako je bilo slučajeva (z. br. 94 i 102) gdje nije bilo takve razlike. Prvih dana mogla se zapaziti kod nekih dlačica i germinacija spora, ali nismo vidjeli da je došlo do punog razvoja saprofitične kulture. Raspadanje gljivičnih elemenata u dlaci razvijalo se vrlo nejednolično i pozitivne kulture, koje su nesumnjivo dokazivale njihovu vitalnost, smo dobili u nekim primjercima (usitnjavanjem dlačice u obliku kaše²⁵ i presađivanjem na Sabouraud maltoze agar sa actidionom) i poslije 12 dana stajanja dlake u steriliziranoj zemlji, a ponekad i kasnije. U prosjeku se to dešavalo poslije 6—8 dana.

Međutim karakteristično je bilo da se proces raspadanja gljivičnih elemenata u dlaci najprije mogao zapaziti na onim mjestima na kojima je postojala obilnija mikrobna flora, koja je u kasnijem razvoju prekrila dlačicu cijelim omotačem i tada je obično i proces raspadanja gljivičnih elemenata u parazitiranoj dlaci bio potpun.

Pošto se radilo o steriliziranom substratu a jedino dlačica koja je stavljena na zemlju nije bila sterilna, moramo pretpostaviti da saprofitična flora koja se pojavljivala oko parazitirane dlačice potječe od autohtonih saprofitičnih banalnih mikroorganizama, koji su sa parazitiranom dlakom dospjeli u steriliziranu zemlju, ondje našli povoljne uslove za svoj razvoj i prouzrokovale raspadanje gljivičnih elemenata kao što se događa u nesterilnoj zemlji pod uplivom njezine mikropopulacije. Moglo bi se također pretpostaviti da je u pitanju onečišćenje banalnim mikroorganizmima iz zraka prilikom pripremanja samog opita, ali se čini da je takva pretpostavka od sekundarne važnosti.

Mogućnost upliva autohtone mikroflore sa kože, odnosno dlake, na gljivične parazite ima oslonca i u rezultatima istraživanja Balabanova^{22, 23}, koji opisuje antagonističko djelovanje (antibiotikotropizam) saprofitičnih mikroorganizama izoliranih sa kože prema dermatofitima u vezi sa mehanizmom mikrobiološke odbrane kože.

U tome smislu nedavno je i Heymer²⁴ objavio svoja ispitivanja o izolaciji streptomyces coelicolor sa kože čovjeka, koji intenzivno inhibira niz patogenih hyphomyceta i kvasnica. Ovaj streptomyces, koji ima antibiotično djelovanje i vegetira saprofitično na koži, vjerovatno predstavlja značajan faktor u održavanju mikrobiološke ravnoteže na koži čovjeka. Tako se može shvatiti i uloga bact. subtilis i alcaligenes koji je izoliran sa kože i koji ispoljava izrazito inhibitorno djelovanje prema nekim dermatofitima pod laboratorijskim uslovima (Chambers i Weidman^{2, 23}).

U daljnoj analizi toga problema smatrali smo potrebnim da ispitamo kako će se ponašati parazitirana dlačica (u steriliziranoj zemlji) ako prethodno uništimo saprofitične mikrobe koji na njoj i okolnim skvamama eventualno vegetiraju. To smo pokušali učiniti na taj način, što smo parazitirane dlačice T. violaceuma prethodno stavili na 24—48 sati u 75% alkohol ili u otopinu antibiotika (penicilin, streptomycin*) ili proveli sterilizaciju u autoklavu na 120 stepeni Cel. za vrijeme od jednog sata.

* 20 jed. penicil. i 40 jed. streptom. na 1 ccm.

Ovi su opiti nedvojbeno pokazali da su u dlaci trihofitije na kojoj je saprofitična flora eliminisana i kada se ona stavi u steriliziranu vlažnu zemlju, gljivični elementi ostaju morfološki intaktni (sl. br. 8, 9, 10), tako dugo dok substrat sadrži svoju sterilnost. U nesterilnoj zemlji odvija se proces lize gljivičnih elemenata kao kada se stavi u zemlju parazitirana nativna dlačica (sl. br. 11, 12).

Prema tome je jasno da razgrađivanje, odnosno liza gljivičnih elemenata u parazitiranim dlakama, zavisi o biokemijskom djelovanju saprofitičnih mikroorganizama koji obitavaju u zemlji ili saprofitiraju kao autohtona mikroflora na samoj dlaci ili okolini. Posljednja mogućnost se pokazala kao tačna i u ovim opitima, jer u parazitiranim dlačicama trihofitije, koje nisu bile potpuno sterilne ili gdje je substrat bio kontaminiran, došlo je u steriliziranoj zemlji do degradacije gljivičnih elemenata prema intenzitetu i razvoju saprofitične flore na samoj dlaci. U takvom slučaju proces lize bio je na početku sasvim nejednoličan i usko vezan za postojanje saprofitične mikroflore oko dlake odnosno u samoj dlaci. Na nekim mjestima u takvom slučaju mikrobi su bili poredani u obliku lanca, kao da se prilagođuju u svom nadiranjju strukturi rasporeda gljivičnih elemenata (sl. br. 13) u dlaci, dok poslije izvjesnog vremena ne nastupi potpuno njihovo raspadanje u homogenu granuliranu masu.

DISKUSIJA

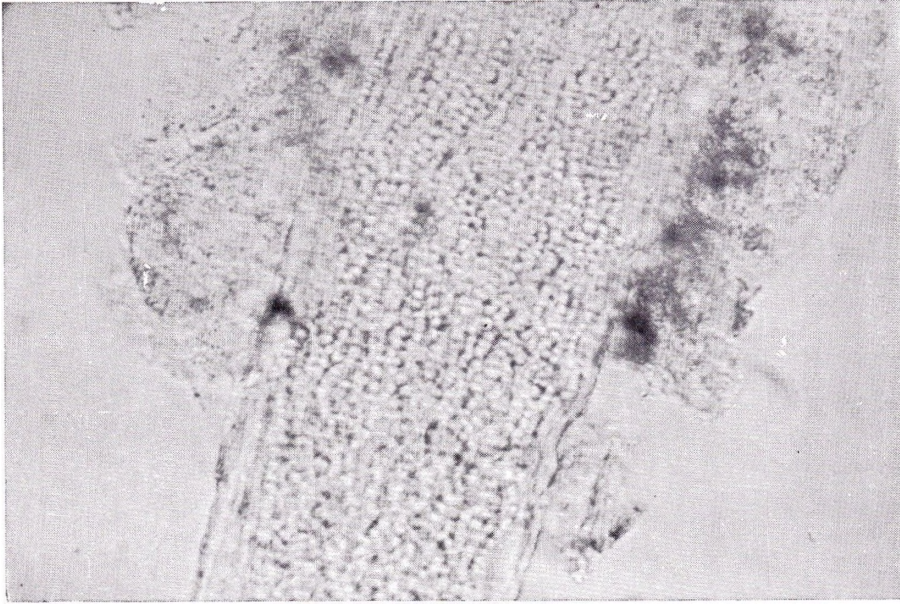
Izvršena su ispitivanja o uplivu zemlje i njene mikropopulacije na patogene dermatofite u patološkom materijalu. Kao test služile su dlačice trihofitije, najčešće *T. violaceum*.

Ta su istraživanja pokazala da parazitirane dlačice stavljene u vlažnu zemlju pod laboratorijskim i prirodnim uslovima zadržavaju svoj oblik dosta dugo, ali da gljivični elementi u njoj postepeno gube svoju konturu, lome slabije svjetlo dok se konačno potpuno ne raspadnu u homogenu granuliranu masu. Keratinska supstanca dlake ostaje kod toga pošteđena i cuticula zadržava dugo vremena svoju primarnu strukturu.

Proces degradacije gljivičnih elemenata ne odvija se uvijek u istom vremenskom razdoblju i događa se ponekad da parazitirane gljivice u dlaci prvih dana boravka u zemlji pokazuju i rudimentarnu germinaciju spora, ali nije dolazilo do punog saprofitičnog razvoja zbog antagonističkog djelovanja mikropopulacije zemlje.

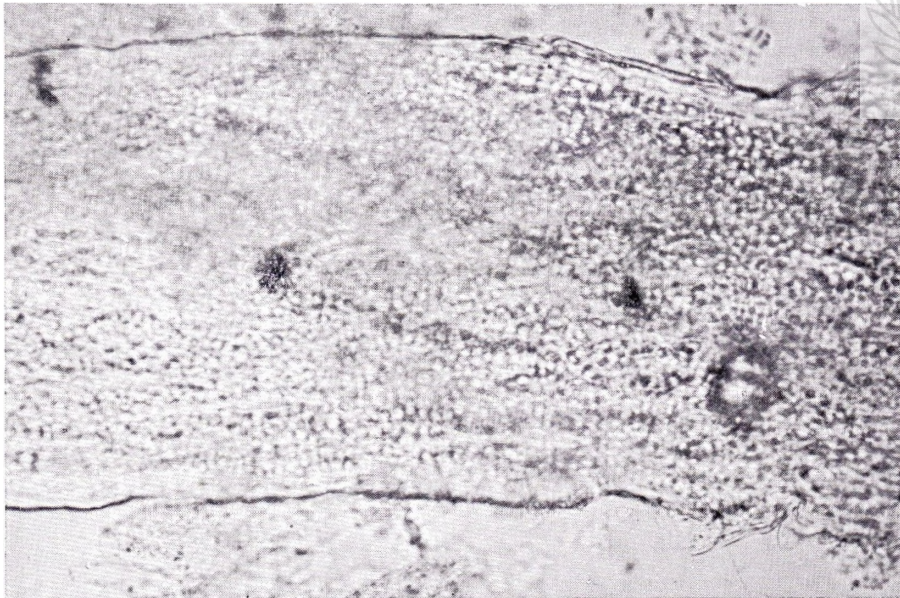
Raspadanje odnosno liza parazitiranih gljivica *T. violaceum* u dlaci nastupa u nesterilnoj vlažnoj zemlji u prosjeku za 6—8 dana, a katkada i ranije, dok je rijetko taj proces trajao duže vremena, kao na primjer kod niske temperature. Međutim, vitalnost gljivica u parazitiranoj dlaci gubi se po pravilu prije nego što nastupe njihove morfološke promjene, što se moglo utvrditi negativnim nalazom kulture na Sabouraud-ovom maltoze agaru sa dodatkom antibiotika.

Ova ispitivanja vršena su sa 18 uzoraka zemlje raznog porijekla i rezultati su bili manje više indentični.



Sl. 9

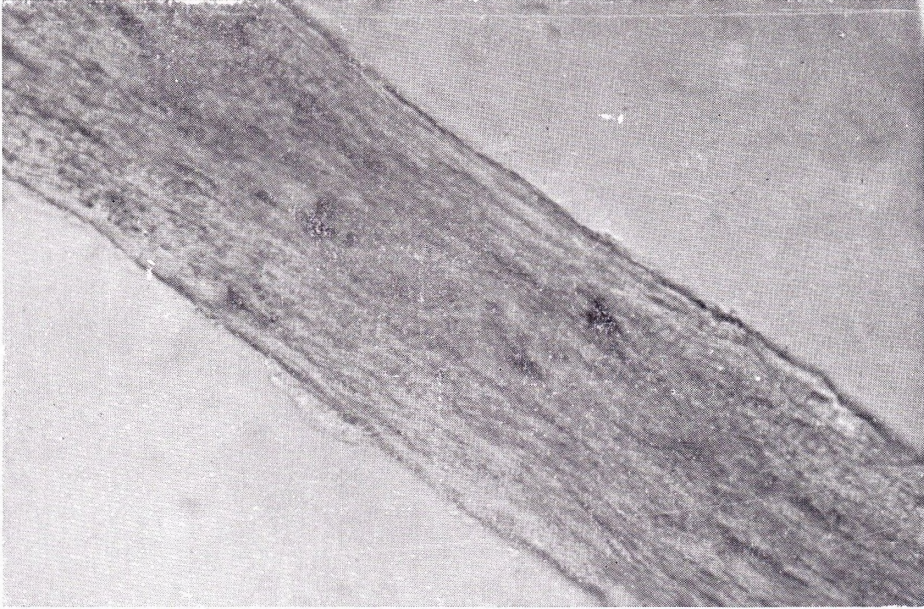
Sterilizirana dlaka *T. violaceum* iz sterilizirane vlažne zemlje poslije sedam dana. Gljivični elementi ostali su intaktni. Nativni preparat u KOH.



Sl. 10

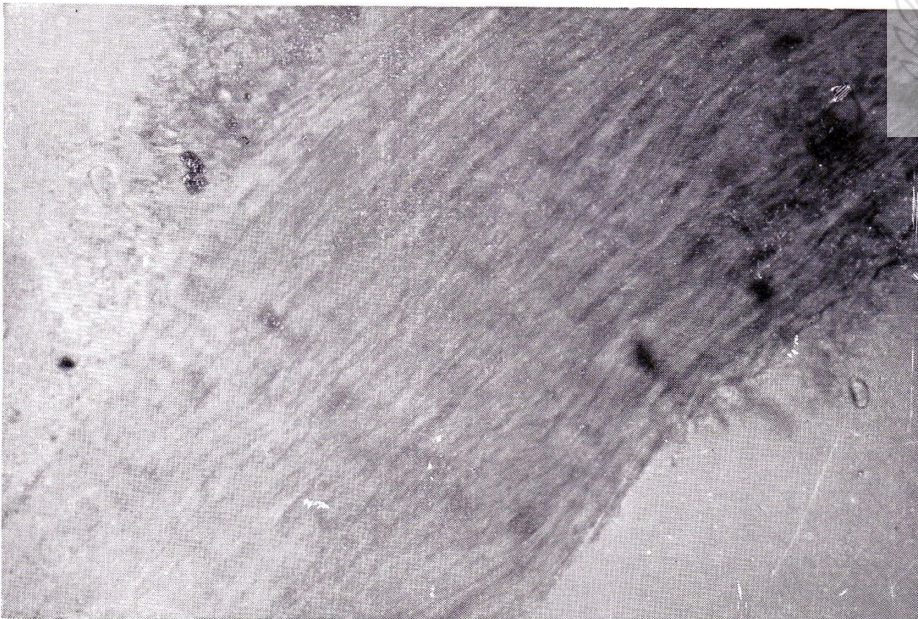
Sterilizirana dlaka *T. violaceum* iz sterilizirane vlažne zemlje poslije osamnaest dana. Spore sačuvane. Nativni preparat u KOH.





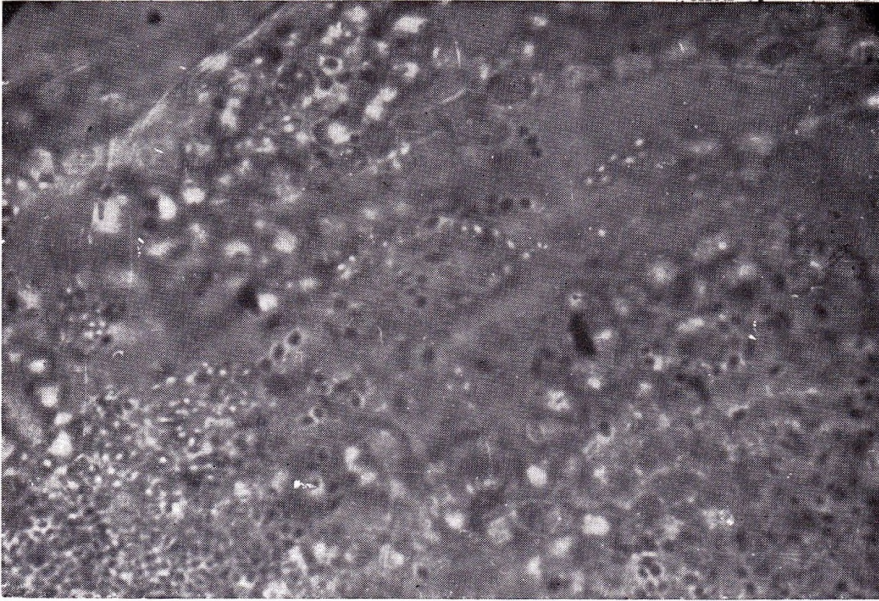
Sl. 11

Sterilizirana dlaka *T. violaceuma* iz nesterilne vlažne zemlje poslije dva dana. Spore dobrim dijelom lizirane. Nativni preparat u KOH.



Sl. 12

Sterilizirana dlaka *T. violaceum* iz nesterilne vlažne zemlje poslije devet dana. Potpuna liza gljivičnih elemenata. Nativni preparat u KOH.



Sl. 13

Sterilizirana dlaka *T. violaceum* iz sterilizirane vlažne zemlje koja je kasnije kontaminirana saprofitičnom florom. Uz sačuvane spore u lancima postoje skupine i lanci saprofitičnih mikroorganizama i gljivice se raspadaju (inerzija 800 ×). Nativni preparat u KOH.



Daljnja ispitivanja išla su za tim da se utvrdi koji su faktori u pitanju što nastupa liza gljivica u patološkom materijalu kada dolazi u kontakt sa zemljom.

U tu svrhu pokušano je da se izoliraju mikroorganizmi iz parazitiranih dlačica koje su izvjesno vrijeme stajale u zemlji i u kojima je već nastupilo raspadanje gljivica. Niz eksperimenata odnosilo se na izolaciju mikroorganizama koji razgrađuju celulozu kao osnovnu biološku pojavu u zemlji. Na podlozi sa filter-papirom (po Imšenecki-u) izolirano je više različitih kolonija mikroorganizama koji su dosta intenzivno rastvarali celulozu filter-papira. Oni odgovaraju, po svom izgledu i mikroskopskoj morfologiji, celuloznim bakterijama koje Winogradsky svrstava u rod *cellfascicula* odnosno *cellvibria*.

Druga ispitivanja odnosila se na mikroorganizme koji su izolirani na običnim podlogama. Izolirano je osam raznih sojeva (koji za sada još nisu determinirani), od kojih je pet pokazalo lizirajuće djelovanje na gljivice u inficiranoj dlaci, a jedan soj pokazivao je očite znake simbioze sa bogatom saprofitičnom germinacijom. Djelovanje ovih izoliranih mikroorganizama bilo je intenzivnije u njihovom primarnom substratu, to jest zemlji.

Čiste kulture izoliranih mikroorganizama djelovale su intenzivnije u nesterilnoj nego u steriliziranoj zemlji, vjerovatno zbog simbiotičnog djelovanja više vrsta mikroorganizama na razgrađivanje gljivičnih elemenata u prirodi.

Od velikog su interesa zapažnja koja se odnose na kontrolne testove u steriliziranoj zemlji. Na početku ostaju u parazitiranim dlakama *T. violaceuma*, koje su stavljene u steriliziranu zemlju prelivenu sterilnom destiliranom vodom, spore dobro sačuvane, ali nekoliko dana kasnije nastupa i ovdje njihovo raspadanje. U takvom slučaju oko dlake su se pojavile veće skupine mikroorganizama za koje moramo pretpostaviti da potječu od autohtone saprofitične flore koja je postojala na patološkom materijalu prije nego je stavljena u steriliziranu zemlju i da su ti mikroorganizmi u sterilnoj zemlji degradirali porazitirane gljivice u dlaci.

U tom smislu izvršena su daljnja ispitivanja koja su trebala da pokažu da li se radi o kemijsko-fizičkim osebinama samog substrata koji djeluje na razgrađivanje patogenih dermatofita u parazitiranoj dlaci u zemlji, ili se radi o neposrednoj biokemijskoj funkciji izvjesnih mikroorganizama koji razgrađuju organsku materiju dermatofita.

U ekstraktima nesterilne zemlje u destiliranoj vodi ili fiziološkoj otopini NaCl, dermatofiti u parazitiranim dlačicama pokazivali su analogne promjene kao i u samoj nesterilnoj zemlji; međutim takvo djelovanje je izostalo kada je ekstrakt prošao kroz Seitzov filter. U ekstraktima alkohola ili etera promjene su također izostale.

Postignuti rezultati izvršenih eksperimenata tako su karakteristični i stalni da se može pretpostaviti da razgrađivanje gljivičnih parazita u inficiranoj dlaci nastaje pod uplivom neposrednog kontakta sa mikroorganizmima, koji svojim metabolizmom vrše fungilitično djelovanje u patološkom materijalu, i da se radi o fundamentalnoj pojavi u prirodi.

To potvrđuje i činjenica u pogledu fungilitičnog djelovanja autohtone saprofitične banalne flore koja se nalazi na samom patološkom materijalu (parazitiranoj dlaci). Kada se naime uništi saprofitična flora prethodnom sterilizacijom patološkog materijala i on stavi u steriliziranu zemlju, gljivice ostaju u dlaci morfološki intaktne, dok substrat zadrži svoju sterilnost. U nesterilnoj zemlji sterilizirane dlačice *T. violaceuma* ponašaju se kao kada se stavi u zemlju svježā parazitirana dlačica, te dolazi do potpunog raspadanja gljivica za nekoliko dana.

Drugačiji je mehanizam djelovanja na parazitiranu dlaku keratinske saprofitične mikropopulacije zemlje koja putem proteolitičnih enzima rastvara samo keratinsku substancu, a ne i parazite u dlaci, što će biti izneseno na drugom mjestu.

Što se tiče pitanja saprofitičnog života patogenih dermatofita u prirodi, odnosno u zemlji, prema iznesenim rezultatima malo je vjerovatno da patogeni dermatofiti, kao *T. violaceum*, koji su stekli tako reći punu parazitarnu i genetski determiniranu specifičnost za keratinski substrat humanog organizma, imaju i sposobnost samostalnog saprofitičnog života u zemlji.

Opisani rezultati, koji pokazuju evidentno da mikropopulacija zemlje i mikroorganizmi saprofitične flore mogu da razgrađuju dermatofite u patološkom materijalu, mogu da posluže kao osnova za mnoga nerješena pitanja u epidemiologiji i patogenezi humane i animalne infekcije patogenim dermatofitima.

ERNEST I. GRIN, INFLUENCE OF SOIL AND ITS MICROPOPULATION ON PATHOGENIC DERMATOPHYTES IN PARASITIZED HAIR

S u m m a r y

Researches and experiments were made designed to test the influence of soil and its micropopulation on pathogenic dermatophytes in pathological material. For these tests mostly were used hairs infected by *Trichophyton violaceum*.

The results have shown that parasitized hairs deposited in moistened soil, under laboratory and natural conditions, retain their shape rather a long time, while the fungal elements in the hairs gradually lose their shape and refract light less intense until, in the end, they completely break up into a homogenous granular mass. The keratin substance of

the hair remains unaffected, the cuticle retaining its primary structure for a longer time.

The process of degradation of fungous elements does not always run its course within the same period, for it sometimes may occur that during the first few days of their stay in the soil the parasitized fungi in the hair tend to show signs of a rudimentary germination of spores without, however, reaching full saprophytic growth owing to the antagonistic action of the micropopulation present in the soil.

The lysis of the parasitized fungi of *T. violaceum* in the hair occurs on an average within 6—8 days, sometimes even sooner; the process seldom takes longer unless the temperature is low. However, the vitality of the fungus in a parasitized hair as a rule tends to disappear before the appearance of morphological changes, as shown by tests which proved negative cultures on Sabouraud's maltose agar with an addition of antibiotics.

Eighteen specimens of soil were used in these tests, and the results were more or less identical.

Further tests were made with the object of establishing the factors responsible for the lysis of the fungus in pathological material when brought into contact with soil.

For this reason, experiments were made to isolate the microorganisms in parasitized hairs that were kept in soil for some time and in which the decomposition of fungi had already taken place. One series of experiments was concerned with the isolation of microorganisms that decompose cellulose as the basic biological manifestation in soil. On a culture-medium with filter-paper (after Imšenecki) several different colonies of microorganisms were isolated, which were found to decompose the cellulose of the filter-paper fairly intensively. In their appearance and microscopic morphology, these correspond to the cellulose bacteria that have been classified by Winogradsky as belonging to the genus of cell-fascicules or cellvibrions.

Another series of tests was concerned with microorganisms that were isolated on conventional culture-media. Eight different (as yet undetermined) strains were isolated, five of which revealed a lysing action on the dermatophytes in infected hairs (one of the strains showing clear signs of symbiosis stimulating germination of the spores). The action of these isolated microorganisms was more intense in their primary substratum, viz. in soil.

The action of pure cultures of isolated microorganisms proved more intense in non-sterile than in sterilized soils, presumably due to the symbiotic action of several species of microorganisms on decomposition of fungous elements in nature.

Of considerable interest are the observations relative to control tests in sterilized soil. In the beginning, the spores remain well conserved in parasitized hairs of *T. violaceum*, deposited into sterilized soil (moistened with sterile water), a few days later, however, they begin to show signs of decomposition. In these instances, around the hair there appeared clusters of microorganisms which must have originated in the autochthonous saprophytic flora that was present in the pathological material before being deposited into sterilized soil.

Tho this effect, further tests were made in order to ascertain whether it was the chemico-physical properties of the substratum itself that were concerned, with the latter having an effect on the decomposing of pathogenic dermatophytes in the parasitized hair in soil, or whether it was a direct biochemical function of certain microorganisms that digest the organic material of dermatophytes.

In extracts of non-sterile soil in distilled water or a physiological solution of NaCl, the dermatophytes in parasitized hairs showed changes analogous to those in non-sterile soil alone, but such action was absent when the extract had passed through a Seitz filter. Nor were there any changes to be observed in alcohol or ether extracts.

The results of these experiments are characteristic and definite enough for the assumption to be made that the decomposing of fungal parasites is brought about under the influence of direct contact with microorganisms which, through their metabolism, are responsible for the fungilic action on pathologic material, and that therefore we are concerned here with one of fundamental phenomena in the nature.

This is confirmed by the fact concerning the fungilic action of the autochthonous saprophytic banal flora that is present in the pathologic material itself (on parasitized hair). For when the saprophytic flora has been destroyed by sterilization and the pathological material deposited into sterilized soil, the fungal elements in the hair remain morphologically intact, while the substratum retains to be sterile. In non-sterile soils the sterilized hairs of *T. violaceum* behave in the same way as fresh parasitized hairs do when deposited into soil; the decomposition of the fungus occurs a few days later.

Of a different kind is the mechanism of action on a parasitized hair of the keratinophilic saprophytic micropopulation of soil (e. g. *M. gypseum*) which by means of proteolytic enzymes decomposes not the parasites in the hair but only the keratinous substance — a matter which will be dealt with in another article.

As regards the question of saprophytic life of pathogenic dermatophytes in nature, i. e. in soil, it can hardly be assumed, according to the results recorded, that pathogenic dermatophytes like *T. violaceum*

— which have reached almost full parasitic and genetically determined specificity for the keratinous substrate of human organism might also possess the ability of independent saprophytic life in soil.

The results recorded above, which clearly show that the micro-population of soil and the microorganisms of saprophytic flora in pathological material are able to decompose the dermatophytes, may well serve as a basis for the solution of a number of problems relating to epidemiology and pathogenesis of human and animal infection with pathogenic dermatophytes.

L I T E R A T U R A

1. Waksman S. A.: Soil Microbiology, N. Y. 1952.
2. Cit. po Wolf, T. F.: Chap. 7 u: Biology of Pathogenic Fungi, Edit. Nickerson, W. J., Waltham, Moss. 1947.
3. Eltig, B.: Arch. f. exp. Dermat. Bd. 207, 1958.
4. Emmons, C. W.: Publ. Health. Reports, Vol. 64, № 28:892, 1949.
5. Emmons, C. W.: Publ. Health. Reports, Vol. 57, № 4:109, 1942.
6. Ajello, L.: Am. J. of Tropical Med. a Hyg. Vol. 1, № 2:227, 1952.
7. Ajello, L.: Bull. Nat. Assoc. of Clin. Labor., Vol. 7, № 1, 1955:11.
8. Ajello, L.: Science, Vol. 123:876, 1956.
9. Gordon, M. A.: Jour. of Invest. Dermatol., Vol. 20, № 3:201, 1953.
10. Grin, E. I. i Ožegović, L.: Nauč. Društvo NR BiH, Rad. VIII, knj. 4, 1957.
11. Frey, D. M. i Durie, E. B.: The Austr. Jour. of Experim. Biology a. Med. Science, Vol. XXXIV:199, 1956.
12. Vanbreuseghem, R.: Arch. belg. Dermat. 8:268, 1952.
13. Georg, L. K. Ajello, L., a. Papageorge C. J.: Lab. a. Clin. Med. 44:422, 1954.
14. Georg, L. K.: Arch. Derm. Syph. 67:355, 1953.
15. Winogradsky, S.: Microbiologie du Sol, Maison, Paris, 1949.
15. Imšenecki, A. A.: Mikrobiologija celulozi. Akad. Nauka SSSR, Moskva, 1953.
17. Henricis Molds, Yeasts a. Actinomycetes sec. Ed. N. Y. 1951.
18. Stahl, W. H. and coworkers: Textile Res. J. 20:570, 1950.
19. Stepaniščeva, Z. G. u: Očerki po gribkovim zabol. koži, Ed. A. M. Arievič i N. M. Turanova, Medgiz, Moskva, 1955.
20. Vanbreuseghem, R.: Arch. belg. Derm. Syph. 13/4, 1957.
21. Garrett, S. D. u Biolog. Aspect of the Transmissin of Disease, Ed. C. Horton-Smith, London, 1957.
22. Balabanov, V. A.: Annaire du L'Univers. de Sofia Fac. de med. Tome XXVI, 1946.
23. Balabanov, V. A.: Compt. Rend. de L'Acad. Bulagre des Scieces, Tome 8, № 2, 1955.



24. Heymer, T.: Arch. klin. exper. Dermatol., 205, 1957.
(cit. po ref. Mykosen Bd. I, Heft 3, 1958).
25. Grin, E. I. i Ožegović, L.: Nova metoda za izolaciju dermatofita sa patološkog materijala od ljudi i životinja (u pripremi).
26. Grin, E. I. i Ožegović, L.: Daljna ispitivanja o uplivu zemlje na dermatofite u patološkom materijalu (u pripremi).

