Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
1
ČÍSLO
3

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, ČERVEN 1956 - STR. 97—144

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

Vedoucí redaktor: Akademik IVAN MÁLEK

Členové redakční rady:

KAREL BERAN, LADISLAV BORECKÝ, MIKULÁŠ BURGER, JOSEF DYR, EVA HLAVÁČKOVÁ, CTIRAD JOHN, JÁN KAROLČEK, JIŘÍ MACURA, redakční tajemník, JIŘÍ MÁLEK, JAN NEČÁSEK, člen korespondent SAV PAVOL NEMEC, KAREL RAŠKA, JAROMÍR SEIFERT, JAROSLAV ŠTERZL

OBSAH

K. Beran a M. Burger: Studium optimálních podmínek pro zcukřování bramborových zápar plísňovými enzymatickými preparáty 97

M. Burger, J. Rokos a P. Procházka: Vliv chlortetracyklinu na aktivitu α-amylásy 105

J. Johanovský: Stav nevnímavosti v průběhu experimentální stafylokokové infekce. II. . . . 111

Z. Trnka: Vliv nedostatku a nadbytku bílkovin v potravě na imunitní odpověď. II. Dlouhodobé vystavení dietám 123

Z. Řeháček: Isolace aktinomycet centrifugací 129

K. Marha a J. Müller: Hodnocení růstových křivek Escherichia coli 135

J. Šterzl a O. Králík: Mikrointervalové imunisace a tvorba protilátek 139

Zprávy 142

Vychází šestkrát ročně * *Roční předplatné 30 Kčs* * *Jednotlivé číslo 5 Kčs*

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 1. (1956) — č. 3

Studium optimálních podmínek pro zcukřování bramborových zápar plísňovými enzymatickými preparáty

KAREL BERAN a MIKULÁŠ BURGER
Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha
Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 20. 12. 1955

Ke studiu otázky o použití plísňových amylolytických preparátů ke zcukřování škrobnatých surovin pro výrobu lihu přispěla velká řada autorů svými pracemi. Výsledky těchto prací vesměs ukazují, že těmito preparáty lze úspěšně nahradit dosud používaný slad. Převážná většina autorů používá různých obilnin jako základních škrobnatých surovin. Pro brambory však chybí dostatečné množství materiálu ke srovnání.

Zájem se soustřeďuje zejména na dva druhy plísní: *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. Preparáty z těchto plísní jsou připravovány jak na pevných substrátech, zejména otrubách (Roberts a spol. 1944, Takamine 1914, Underkofler a spol. 1939, 1946, Lu-Cheng Hao a spol. 1943), tak na tekutých submersně. Pro submersní přípravu preparátů se používá hlavně *A. niger* (Le Mense a spol. 1949, Adams a spol. 1947, Teixeira a spol. 1950).

Teploty při zcukřování škrobnatých surovin plísňovými preparáty jsou různé. U *A. oryzae* se nejčastěji uvádí 50—55 °C (Underkofler a spol. 1939, Lu Cheng Hao a spol. 1943, Roberts a spol. 1944), ale též 30 °C (Lu Cheng Hao a spol. 1943, Roberts a spol. 1944), u *A. niger* tytéž nebo o něco vyšší, 60 až 62 °C (Le Mense a spol. 1949, Adams a spol. 1947).

Tyto vyšší teploty však většinou nemají charakter zcukřovacích teplot tak, jak jsou chápány v našem významu pro technologický proces (Underkofler a spol. 1946, Adams a spol. 1947, Teixeira a spol. 1950). Během zcukřování bývá hodnota pH u obou preparátů udržována na stejné výši kolem 5,5.

V nedávno publikované práci jsme ukázali na velký vliv teploty na aktivitu maltásy při hydrolyse škrobu enzymatickým preparátem plísně *A. niger* (Burger a Beran 1956). Aktivita maltásy byla 7,3krát větší při 65 °C než při 30 °C. Z těchto důvodů jsme se rozhodli prověřit optimální podmínky, teplotu a pH při zcukřování bramborových zápar plísňovými preparáty.

Materiál a metody

Enzymatické preparáty a materiál

K práci jsme použili enzymatických preparátů dvou druhů plísní, *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* a sušeného diastatického sladu. Plísně jsme kultivovali na otrubách. Kultivaci plísní a přípravu enzymatických preparátů jsme popsali již dříve (Burger a Beran 1954, 1956). Na rozdíl od uvedených prací jsme filtrovali enzymatické extrakty plísní poresním skleněným kelímkem (G_4). K přípravě zápar jsme použili bramborových vloček, které obsahovaly 65,58 % škrobu, nebo rozpustného škrobu p. a. (Lachema).

Analytické metody

Zkvasitelné cukry glukosu, maltosu a maltotriosu jsme stanovili již popsanou metodou (Beran a Burger 1955). Základ metody spočívá v tom, že vzorky vykvasíme kvasinkami *Saccharomyces*

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

cerevisiae R XII za přítomnosti 2,4-dinitrofenolu a množství vykvašeného cukru propočteme podle objemu vzniklého kysličníku uhličitého na základě Gay-Lussackova stechiometrického vztahu. Stanovené množství zkvasitelných cukrů jsme vyjádřili jako glukosu. Chromatografickou analysu cukrů jsme dělali podle popsané metody (Green a Stone 1952), kterou jsme upravili. Dextrinační aktivitu jsme stanovili upravenou metodou Wohlgemutovou (Belozerskij a Proskurjakov 1951); též jodová zkouška byla provedena roztokem jodu a s množstvím vzorků uvedeným u této metody.

Příprava substrátů a postup při zcukřování

K pokusům jsme použili bramborových zápar, připravených z bramborových vloček, o konečném obsahu škrobu 5 a 10 % (viz dále). Do zkumavek o průměru 3 cm jsme navážili příslušné množství jemně rozemletých bramborových vloček a přidali takové množství vody, aby po přidání plísňového enzymatického extraktu činil konečný objem zápary 25 ml. Po rozmíchání bramborové moučky s vodou jsme zkumavky s obsahem autoklavovali ½ hodiny při ½ atm. Zkumavky po autoklavování jsme udržovali ve vodní lázni při 50 °C.

Při sledování vlivu pH na dextrinační aktivitu plísňových preparátů jsme použili stejného množství 15% roztoku rozpustného škrobu. Sledovaného rozsahu pH u preparátu *A. niger* (3,5 až 6,5) jsme dosáhli acetátovým pufrem o konečné koncentraci 0, 1 M a u *A. oryzae* (7,6 až 4,6) veronal-acetátovým pufrem o konečné koncentraci 0,02 M.

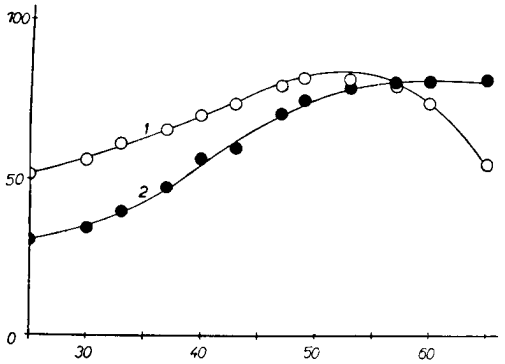
K takto připraveným substrátům jsme odměřili takové množství enzymatického extraktu, aby použitá váha suchého plísňového preparátu činila 10 % váhy v pokuse přítomného škrobu. Výjimky z tohoto poměru jsou uvedeny u příslušných pokusů.

Zkumavky se substráty jsme umístili ve vodní lázni. Studovali jsme vliv teploty v rozsahu 25 až 80 °C. Není-li uvedeno jinak, zcukřovací doba činila 1 hodinu. Po uvedené době byl enzymatický proces zastaven ponořením zkumavek do vroucí lázně a po ochlazení provedeny příslušné analysy.

Výsledky

Tvorba zkvasitelných látek při zcukřování bramborových zápar s obsahem 5 % škrobu

Sledovali jsme množství vytvořených zkvasitelných látek při zcukřování bramborové zápary o obsahu 5 % škrobu v teplotním rozsahu 25 až 65 °C. Použité množství suchých enzymatických preparátů činilo 15 % váhy škrobu. Výsledky pokusu jsou uvedeny na obr. 1 a 2.



Obr. 1. Vliv teploty na tvorbu zkvasitelných látek při zcukřování bramborových zápar s obsahem 5 % škrobu. Osa y : mg zkvasitelných látek vyjádřených jako glukosa v 2,5 ml vzorku, osa x : teplota v °C. Křivka 1-*A. oryzae*, 2-*A. niger*.

Jak je patrno z obr. 1, teplotní optimum tvorby zkvasitelných látek při zcukřování bramborové zápary preparátem *A. oryzae* leží mezi 50 a 60 °C a u preparátu *A. niger* nebylo teplotou 65 °C překročeno. Plochost uvedených křivek je možno vysvětlit velkým obsahem enzymů a nedostatkem substrátu v systému.

Zcukřovací zkouška roztokem jodu ukázala, že achroického bodu bylo dosaženo u preparátu *A. oryzae* již při teplotě 40 °C, u preparátu *A. niger* teprve při teplotě 65 °C. U preparátu *A. niger* se do této teploty objevila celá škála barev, charakterisující stupeň hydrolysy škrobu, od fialové při teplotě 25 °C až po achroickou při teplotě 65 °C.

Na obr. 2 jsou uvedeny chromatogramy zápar po zcukření preparátem *A. niger*, *A. oryzae* a sladem při teplotách 25, 47, 57 a 65 °C. Patrné rozdíly v rozložení jednotlivých cukrů jsou výsledkem různého enzymatického složení jednotlivých

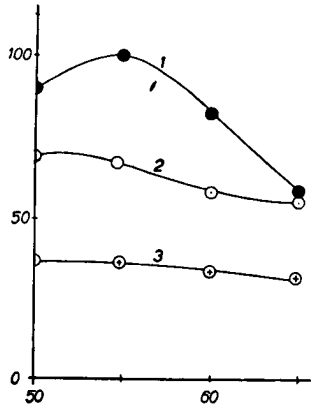
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

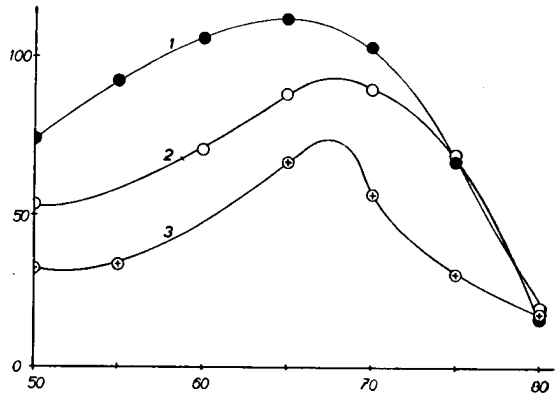
preparátů, na které již bylo dříve upozorněno (Feniksová 1953, Klimovskij a Rodzevič 1950, Burger a Beran 1954, Stárka 1954). U chromatogramů zápar zcukřených preparátem *A. niger* je dobře patrné značné množství transglukosidací vzniklé isomaltosy a vzestupem teploty ubývající množství maltotriosy.

Tvorba zkvasitelných látek při zcukřování bramborových zápar s obsahem 10% škrobu

Vzhledem k tomu, že u předcházejícího pokusu se projevil nedostatek substrátu, opakovali jsme jej na zápaře s obsahem škrobu 10 % a s menším množstvím enzymatického preparátu (10 % váhy škrobu). Sledovaný teplotní rozsah byl zúžen na 50 až 80 °C u preparátu *A. niger* a 50 až 65 °C u preparátu *A. oryzae*. Zároveň jsme sledovali množství vytvořených zkvasitelných cukrů při těchto teplotách po 20,



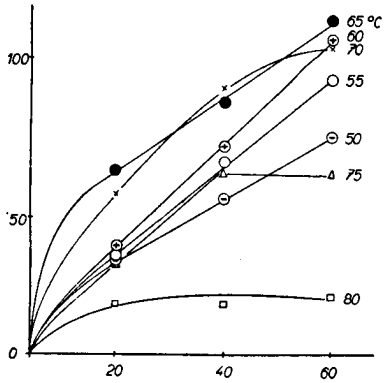
Obr. 3. *A. oryzae*



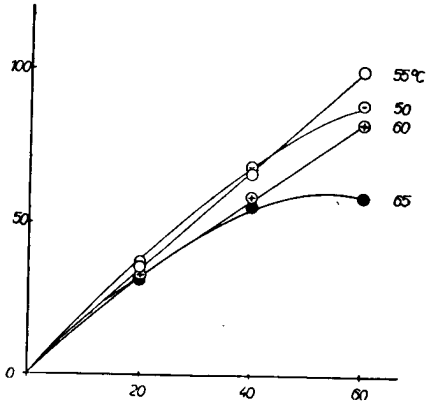
Obr. 4. *A. niger*

Vliv teploty na tvorbu zkvasitelných látek při zcukřování bramborové zápary plísňovými preparáty (obsah škrobu v zápaře 10 %)

Osa x : teplota v °C, osa y : mg zkvasitelných látek vyjádřených jako glukosa v 2,5 ml vzorku. Křivka 1 — zcukřováno 60 minut, 2 — 40 minut, 3 — 20 minut.



Obr. 5. *A. niger*



Obr. 6. *A. oryzae*

Průběh tvorby zkvasitelných látek při zcukřování bramborových zápar plísňovými preparáty za různých teplot (obsah škrobu v zápaře 10 %).

Osa x : doba zcukřování v minutách, osa y : mg zkvasitelných látek vyjádřených jako glukosa v 2,5 m vzorku.

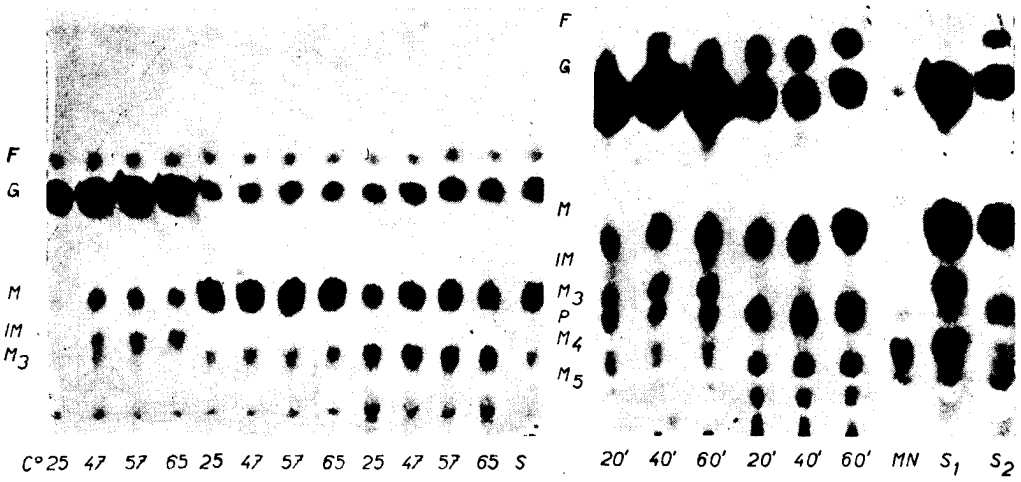
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

40 a 60 minutách zcukřování. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na obr. 3, 4, 5, 6 a 7.

Jak je patrno z obr. 3 a 4, liší se preparáty *A. niger* a *A oryzae* svými optimálními teplotami. Po 60 minutách zcukřování činí optimální teplota u preparátu *A. oryzae* 55 °C a u preparátu *A. niger* 65 °C. Při těchto teplotách se vytvořilo u *A. oryzae* 46,6 %, u *A. niger* 56,1 % zkvasitelných látek vzhledem k množství přítomného škrobu. Na obr. 5 a 6 je uvedeno množství zkvasitelných látek v závislosti na čase. Z lineárního průběhu křivek u preparátu *A. niger* až do teploty 65 °C a u *A. oryzae* u teploty 55 °C je zřejmé, že zřetelná inaktivace enzymů nastává až po těchto optimálních teplotách.

Chromatografická analysa produktů vzniklých při zcukřování bramborové zápary s obsahem 5 % škrobu. Průběh tvorby produktů vzniklých při zcukřování bramborových zápar plísňovými preparáty v optimálních teplotách (*A. niger* 65 °C, *A. oryzae* 55 °C)



Obr. 2. Obr. 7.

F - fruktosa, G - glukosa, M - maltosa, IM - isomaltosa, M_3 - maltotriosa, P - panosa, M_4 - maltotetraosa, M_5 - maltopentaosa, MN - maltosa inkubovaná preparátem *A. niger* za současného vykvašování kvasinkou *S. cerevisiae* R XII, S_1 - maltosa po inkubaci preparátem *A. niger*, S_2 - sladina

Zcukřovací zkoušky roztokem jodu ukázaly, že u preparátu *A. oryzae* bylo dosaženo achroického bodu po 60minutovém zcukřování u všech sledovaných teplot, ale již po 40 a 20minutovém zcukřování byl dosažený barevný tón pouze žlutohnědý. U preparátu *A. niger* bylo žlutohnědého tónu dosaženo jen při teplotě 65 °C po 60minutovém zcukřování. Při uvedené teplotě byl po 40minutovém zcukřování barevný tón jasně červený a po 20minutovém červenohnědý. Uvedené zbarvení vzorků bylo nejsvětlejší v celé sledované škále teplot a času. V ostatních případech zbarvení vzorků jodovým roztokem vykazovalo různý stupeň odbourání škrobu.

Na obr. 7 jsou uvedeny chromatogramy zápar zcukřovaných při optimálních teplotách (*A. niger* 65 °C, *A. oryzae* 55 °C) po 20, 40 a 60 minutách zcukřování. U zápar zcukřovaných preparátem *A. niger* je patrná značná tvorba isomaltosy vzniklé transglukosidací; množství isomaltosy časem vzrůstá, dále značné množství maltotriosy, ale malé množství panosy a maltotetraosy. Chromatogramy zápar zcukřovaných preparátem *A. oryzae* vykazují rozložení cukrů, které je charakteris-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

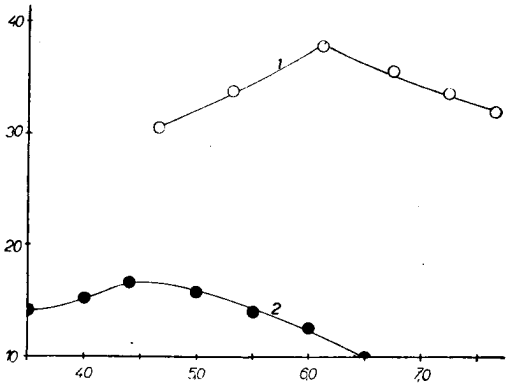
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

tické pro činnost α-amylásy: malé množství monosacharidů a velké množství oligosacharidů a vyšších složek. Těchto vyšších složek časem ubývá. Jako standardy jsou uvedeny chromatogramy sladiny a maltosy inkubované s enzymatickým preparátem *A. niger*, jejichž rozložení cukrů při chromatografii je známé. Chromatogram maltosy inkubované s extraktem *A. niger* po vykvašení kvasinkou *S. cerevisiae* R XII, aniž enzymatická činnost preparátu byla zastavena, ukazuje, že je odbourávána za těchto podmínek nejen maltotriosa, ale i isomaltosa a částečně panosa. To potvrzuje naše dřívější nálezy (Burger a Beran 1954).

Vliv pH na dextrinaci škrobu

V tomto pokuse jsme použili různého množství enzymatických preparátů. Preparát *A. niger* jsme přidávali v množství 10 % váhy škrobu v pokuse přítomného, *A. oryzae* 5,6 %. Pracovali jsme při výše zjištěných optimálních teplotách. Výsledky jsou uvedeny na obr. 8.

Jak je patrno z obr. 8, liší se enzymatické preparáty *A. niger* a *A. oryzae* též svými optimálními hodnotami pH pro dextrinaci škrobu. Nalezené optimální pH u preparátu *A. niger* činilo 4,5 a u *A. oryzae* 6,1. Průběh křivek ukazuje, že u preparátu *A. niger* je dextrinační aktivita ovlivněna nízkými hodnotami pH jen málo, naproti tomu u *A. oryzae* značně.

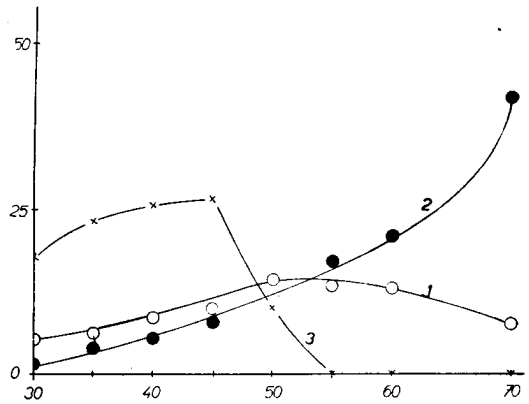


Obr. 8. Vliv pH na aktivitu dextrinace škrobu. Osa x : hodnoty pH, osa y : jednotky α-amylásy. Křivka 1 — *A. oryzae*, 2 — *A. niger*.

Tvorba zkvasitelných látek v nepufrovaném roztoku 10 % škrobu

Sledovali jsme tvorbu zkvasitelných látek, vznikajících při hydrolyse škrobu sladem, preparátem *A. niger* a *A. oryzae*. Použitý 10% roztok rozpustného škrobu nebyl pufrován. Zcukřovací doba činila 30 minut. Výsledky jsou uvedeny na obr. 9.

Během inkubace došlo k značnému okyselení substrátů. U pokusu se sladem kleslo pH na hodnotu 3,2, s preparátem *A. niger* na hodnotu 3,5 a s *A. oryzae* na 5. Jak je patrno, projevil se tento pokles pH značně nepříznivě na tvorbě zkvasitelných látek, zejména u sladu. Též tvorba zkvasitelných látek u preparátu *A. oryzae* byla tím ovlivněna, ale u preparátu *A. niger* nikoliv. To je v souhlase s nálezy předcházejícího pokusu. Poněvadž bylo zcukřováno pouze ½ hodiny, je pochopitelné, že se optimální teploty posunují k vyšším teplotám.



Obr. 9. Vliv teploty na tvorbu zkvasitelných látek při hydrolyse 5 % nepufrovaného roztoku rozpustného škrobu (doba zcukření 30 minut). Osa x : teplota v °C, osa y : mg zkvasitelných látek vyjádřených jako glukosa v 2,5 ml vzorku. Křivka 1 — *A. oryzae*, 2 — *A. niger*, 3 — slad.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Diskuse

Různí autoři používají při zcukřování škrobnatých surovin plísňovými preparáty různých zcukřovacích teplot. Při použití preparátů *A. oryzae* se pohybují tyto teploty od 30 do 55 °C, u *A. niger* od 50 do 62 °C. Dosud neznáme dostupnou soustavnou studii, sledující otázku optimálních teplot při zcukřování škrobnatých surovin plísňovými preparáty v podmínkách technologického procesu. Zdá se proto, že dosud používané zcukřovací teploty jsou výsledkem náhodných nálezů či obdob při použití sladu.

V teoreticky zaměřené práci při sledování vlivu teploty na aktivitu enzymatických systémů při hydrolyse škrobu preparáty *A. niger* a *A. oryzae* jsme ukázali na velký vliv teploty na aktivaci maltásy plísně *A. niger* (Burger a Beran 1956). Platnost zjištěných optimálních teplot při hydrolyse 10% roztoku rozpustného škrobu po 60 minutovém zcukřování (*A. niger* 65 °C, *A. oryzae* 55 °C) byla potvrzena na záparách připravených z bramborových vloček. Při těchto optimálních teplotách nenastává ještě zřetelná inaktivace enzymů. Jak vyplývá z jodových zkoušek, souhlasí tyto teploty též s optimy dextrinační činnosti užitých preparátů.

Optimální podmínky pro hydrolytickou činnost plísňových preparátů *A. niger* a *A. oryzae* se liší nejen v optimálních teplotách, ale též v různém optimálním pH na jejich dextrinační aktivitu. Optimální pH pro dextrinaci škrobu preparátem *A. oryzae* je 6,10; změnou pH (zejména snižováním) jeho aktivita značně klesá. Chování enzymatického preparátu *A. oryzae* je tedy podobné jako u sladu, jehož zcukřovací schopnost byla zcela zabrzděna při poklesu pH na hodnotu 3,2 ve směru k vyšším teplotám (od 55 °C), kdy teplota inaktivuje i β-amylásu. Tyto nálezy souhlasí se známým jevem o citlivosti α-amylásy k nižším hodnotám pH. Z tohoto důvodu není možno okyselovat zápary připravené se sladem.

Optimální pH pro dextrinaci škrobu u preparátu *A. niger* je 4,5 a shoduje se tedy s optimálním pH pro činnost plísňové maltásy. Tento nález je v dobré shodě se zjištěním popsaným dříve (Burger a Beran 1956), že v preparátech *A. niger* maltása hydrolysuje celou molekulu škrobu isolovaně od α-amylásy. Též změny pH v dosti širokém rozmezí mají jen malý vliv na změnu aktivity. Toto chování preparátu *A. niger* pravděpodobně souvisí s fysiologickými vlastnostmi plísně *A. niger*, která je schopna tvořit též značná množství kyselin. Možnost užití nižšího pH při zcukřování bramborových zápar má svůj důležitý význam pro zemědělské lihovarnictví. Umožňuje značné okyselení zápar již při zcukřování škrobnatých surovin a spojený účinek nízkého pH a relativně vysoké zcukřovací teploty se musí projevit v mikrobiologické čistotě zápar. Též při kvašení má hodnota pH 4,5 příznivý vliv na průběh kvašení a zabraňuje rozmnožení nežádoucí infekce.

Souhrn

Sledovali jsme vliv teploty na tvorbu zkvasitelných cukrů a vliv pH na dextrinační aktivitu při hydrolyse škrobu a bramborových zápar enzymatickými preparáty plísní *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* (plísňových otrub). Zjistili jsme toto:

1. Při sledování vlivu teploty na tvorbu zkvasitelných cukrů u zcukřovaných bramborových zápar (doba zcukřování 60 minut) jsme nalezli různé optimální teploty účinnosti obou preparátů: *A. niger* 65 °C a *A. oryzae* 55 °C.
2. Při těchto teplotách se vytvořilo preparátem *A. oryzae* 46,6 %, preparátem *A. niger* 56,1 % zkvasitelných látek vzhledem k přítomnému škrobu.
3. Optimální zcukřovací teploty souhlasí též s optimální činností dextrinační.
4. Optimální hodnotou pH pro dextrinaci škrobu preparátem *A. oryzae* je 6,1; změnou pH (zvláště snižováním) je dextrinace značně zeslabována.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

5. Optimální hodnotou pH pro dextrinaci škrobu preparátem *A. niger* je 4,5; změny pH ji jen málo ovlivňují.

6. Zjišťovali jme význam nízkého pH a relativně vysoké teploty při zcukřování škrobnatých surovin preparátem *A. niger* v lihovarské praxi.

Akademiku I. Málkovi děkujeme za zájem a podnětné připomínky při provádění této práce. E. Masnerové a V. Klicperové děkujeme za pečlivou technickou spolupráci.

Literatura

Adams, S. L., Balankura, B., Andreasen, A. A., Stark, W. H.: *Submerged culture of fungal amylase.* Ind. Eng. Chem. 39 : 1615, 1947.

Beran, K., Burger, M.: *Nová gasometrická metoda stanovení cukrů vykvašováním za přítomnosti 2,4-dinitrofenolu.* Chem. listy 49 : 1693, 1955.

Belozerskij, A. N., Proskurjakov, N. I.: *Praktičeskoje rukovodstvo po biochimiji rastenij.* Moskva 1951.

Burger, M., Beran, K.: *K otázce mechanismu hydrolysy dextrinů plísňovými enzymatickými preparáty.* Chem. listy 48 : 1394, 1954.

Burger, M., Beran, K.: *O mechanismu účinku maltásy plísně Aspergillus niger. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plísňovými preparáty.* Chem. listy 50 : 133, 1956.

Feniksová, R. V.: *Plesnevyje griby iz roda Aspergillus kak producenty amilazy.* Mikrobiologija 22 : 28, 1953.

Green, S. R., Stone, I.: *Fermentability of wort trisaccharide, a factor in variable attenuations.* Wallerstein Lab. Comm. 15, 51 : 347, 1952.

Klimovskij, D. N., Rodzevič, V. Z.: *Amilolitičeskije fermenty u aspergilov.* Mikrobiologija 19 : 60, 1950.

Lu Cheng Hao, Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: *Fungal amylase as saccharifying agents in the alcoholic fermentation of corn.* Ind. Eng. Chem. 35 : 814, 1943.

Lu Cheng Hao, Jump, J. A.: *Microbiol. amylase preparation conversion agents for alcoholic fermentation.* Ind. Eng. Chem. 37 : 521, 1945.

Le Mense, E. H., Lohns, V. E., Corman, J., Blom, R. H., Van Lanen, J. M., Langlykke, A. F.: *Grain alcohol fermations submerged mold amylase as a saccharifying agent.* Ind. Eng. Chem. 41 : 100, 1949.

Roberts, M., Laufer, S., Stewart, F. D., Laletan, L. I.: *Saccharification of wheat by fungal amylases for alcohol production.* Ind. Eng. Chem. 36 : 811, 1944.

Schwene, L., Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: *Saccharification of starch grain mashes for the alcoholic fermentation industry.* Ind. Eng. Chem. 32 : 544, 1940.

Stárka, J.: *Hodnocení amylolytických enzymových preparátů papírovou chromatografií.* Čs. biologie 3 : 230, 1954.

Takamine, J. O.: *Enzymes of Aspergillus oryzae and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry.* Ind. Eng. Chem. 6 : 824, 1914.

Teixeira, C., Andreasen, A. A., Kolachov, P.: *Ethyl alcohol from casava.* Ind. Eng. Chem. 42 : 1781, 1950.

Underkofler, L. A., Fulmer, E. I., Schwene, L.: *Saccharification of starch grain mashes for the alcoholic fermentation industry.* Ind. Eng. Chem. 31 : 734, 1939.

Underkofler, L. A., Severson, G. M., Goering, K. J.: *Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. Plant-scale use of mold amylase.* Ind. Eng. Chem. 38 : 980, 1946.

Изучение оптимальних условий осахаривания картофельных заторов плесневыми ферментными препаратами

К. Беран и М. Бургер

Резюме

Изучалось влияние температуры на образование сбраживаемых сахаров и влияние pH на декстринизирующую способность при гидролизе крахмала и картофельных заторов ферментными препаратами плесеней Aspergillus niger и Aspergillus oryzae (плесневого солода). Было установлено, что различие между препаратами A. niger и A. oryzae в отношении образования сбраживаемых сахаров при 60 минутном осахаривании картофельных заторов проявляется их оптимальными температурами. (A. niger 65 °C, A. oryzae 55 °C.) При этих температурах под действием препарата A. oryzae образовалось 46,6 % сбраживаемых веществ, а под действием препарата A. niger, соответственно, 56,1 %, от присутствующего крахмала. Оптимальные температуры соответствуют также оптимальному декстринизирующему действию. Оптимальным pH для декстринизации крахмала препаратом A. oryzae является pH = 6,1, причем изменение pH, в особенности в сторону повышения кислотности, вызывают значи-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

тельное понижение декстринизации. Оптимальным pH для декстринизации крахмала препаратом A. niger является pH = 4,5, причем изменения pH оказывают на декстринизацию лишь незначительное влияние. Обсуждается вопрос о значении низкого pH и сравнительно высокой температуры при осахаривании крахмалсодержащих материалов препаратом A. niger в практике спиртовой промышленности.

A Study of Optimal Conditions for the Saccharification of Potato Mash by Fungoid Enzymatic Preparations

K. Beran and M. Burger

Summary

A study was made of the influence of temperature on the formation of fermentable sugars and of the influence of pH on dextrination activity in the hydrolysis of starch and potato mash by enzymatic preparations of the moulds Aspergillus niger and Aspergillus oryzae (mould bran). The findings were as follows: On 60 minutes' saccharification of potato mash, preparations of A. niger and A. oryzae differed in relation to the formation of fermentable sugars as regards their optimal temperatures (A. niger 65 °C, A. oryzae 55 °C). At these temperatures the preparation of A. oryzae formed 46.6% and the preparation of A. niger 56.1% fermentable sugar in relation to the amount of starch present. The optimal temperatures also correspond to optimal dextrination activity. Optimal pH for the dextrination of starch by the preparation of A. oryzae is 6.1 and a change in pH in the acid direction causes a considerable decrease. Optimal pH for the dextrination of starch by the preparation of A. niger is 4.5 and changes in pH have little effect. The significance of a low pH and the relatively high temperature in the saccharification of starchy raw materials by the A. niger preparation is discussed with reference to distilling practice.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 3

Vliv chlortetracyklinu na aktivitu α-amylásy

MIKULÁŠ BURGER, JOSEF ROKOS a PAVEL PROCHÁZKA

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha
Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 4. 1. 1956

Při fermentaci chlortetracyklinu kmenem *Actinomyces aureofaciens* obsahuje produkční půda obvykle zdroj škrobu (Van Dyck a De Sommer 1952), který je během fermentace odbourávána na nižší štěpy. Míra hydrolysy škrobu a možnost využití vznikajících cukrů jsou pak závislé na činnosti amylolytických enzymů.

Bylo možno předpokládat, že při hromadění chlortetracyklinu ve fermentačním mediu, zejména při vyšších koncentracích tohoto antibiotika, bude ovlivněna činnost enzymů, hydrolysujících škrob (Arora a Krishna Murti 1952). I když škrobnaté suroviny (sojová mouka a jiné), obsažené ve fermentační půdě, mají pravděpodobně také jinou funkci než jako pouhý zdroj uhlíku, je nutné z ekonomických důvodů řídit proces tak, aby došlo k důkladnému využití i samotného škrobu.

Ke studiu vlivu chlortetracyklinu na amylolytické enzymy jsme použili enzymatického preparátu, připraveného z plísně *Aspergillus oryzae*, o němž je známo, že za našich pokusných podmínek hydrolysuje škrob výlučně α-amylásou (Burger a Beran 1956). Nalezli jsme silný inhibiční vliv vyšších koncentrací chlortetracyklinu na tento enzym při dextrinaci škrobu.

Úkolem této práce bylo prostudovat podmínky, při kterých nastává inhibice, a pokusit se najít způsob, jakým by ji bylo možno odstranit, abychom mohli na základě těchto údajů studovat činnost α-amylásy při fermentaci chlortetracyklinu produkčním kmenem *Actinomyces aureofaciens*.

Materiál a metody

Analytické metody. Aktivitu α-amylásy jsme stanovili modifikovanou Wohlgemuthovou metodou (Bělozerskij a Proskurjakov 1951), kterou jsme upravili. Visuální srovnávání jodoškrobového komplexu se standardním roztokem jsme nahradili stanovením na Pulfrichově kolorimetru. Z naší sady standardních filtrů se nejlépe osvědčil červený filtr S 66, při kterém vykazoval jodoškrobový komplex nejvyšší absorpci. Dobu dextrinace škrobu, potřebnou k vypočítání amylolytických jednotek podle Wohlgemutha, jsme zjišťovali extrapolací konečných hodnot propustnosti. Aktivitu α-amylásy uvádíme jednak v jednotkách (Bělozerskij a Proskurjakov 1951), jednak v procentech propustnosti vzhledem k standardnímu roztoku.

Použité chemikálie. Použili jsme rozpustného škrobu p. a. (Lachema), chlortetracyklinu s 50% biologickou aktivitou (Lederle Lab.) a ostatních chemikálií analyticky čistých.

Pracovní postup. K práci jsme použili enzymatického preparátu *A. oryzae*, který za našich pokusných podmínek dextrinuje škrob výlučně pomocí α-amylásy (Burger a Beran 1956). Suspensi tohoto preparátu ve fysiologickém roztoku jsme filtrovali a filtrát dialysovali 24 hodin při pokojové teplotě proti 400krát většímu objemu redestilované vody 3krát vyměňované. Množství použitého enzymu bylo voleno tak, aby dextrinace proběhla asi za 45 minut. Konečná koncentrace škrobu byla 1%. Pokud nebude jinak uvedeno, byla reakční směs udržována při pH 5,6 0,1 M acetátovým pufrem. Inkubace probíhala při teplotě 30 °C ve vodní lázni. Uváděné koncentrace antibiotika jsou vztaženy na konečná množství biologicky aktivního chlortetracyklinu. pH reakčního roztoku jsme po každém pokusu kontrolovali elektronkovým pH-metrem se skleněnou elektrodou.

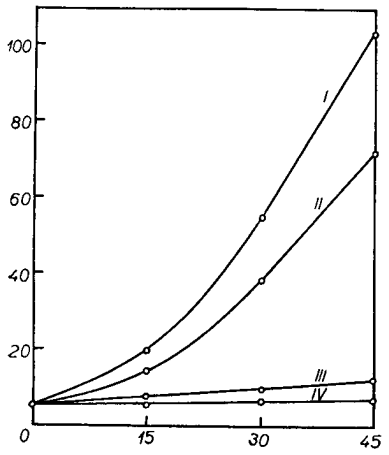
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

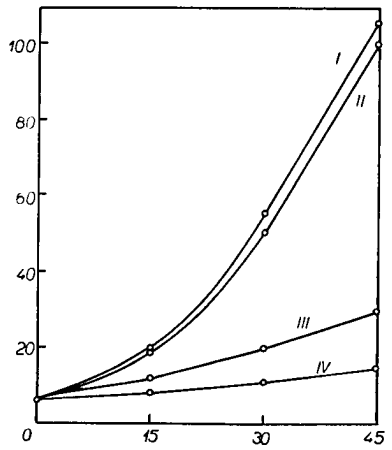
Výsledky

Vliv pH a pufrů na inhibici dextrinace škrobu

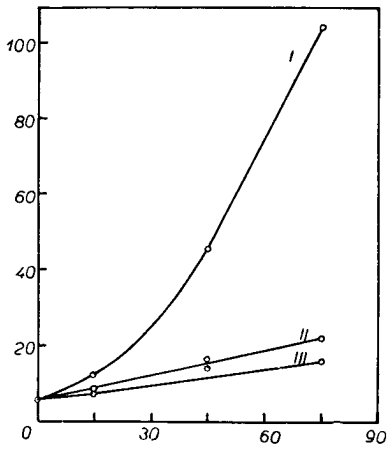
Zjistili jsme, že chlortetracyklin má ve vyšších koncentracích brzdící vliv na činnost α-amylásy plísně *A. oryzae*. Koncentrace chlortetracyklinu, při které již dochází k inhibici, se pohybuje od 8 . 10^{-4} M do 1,2 . 10^{-3} M (obr. 1—3).



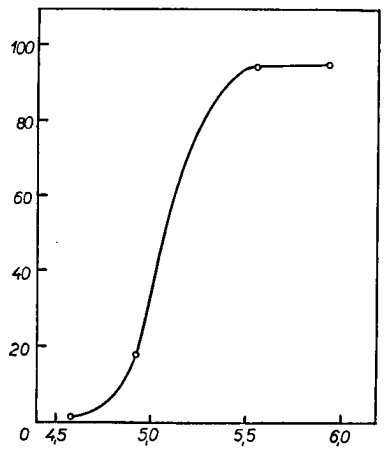
Obr. 1. Vliv koncentrací chlortetracyklinu na inhibici α-amylásy *A. oryzae* ve fosfátovém pufru pH 6,0. Osa x = čas v min., osa y = propustnost v %. pH roztoku 6,0, pufrováno fosfátovým ústojem konečné koncentrace 0,01 M. I: kontrola, II: 400 μg, III: 600 μg, IV: 800 μg a 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml.



Obr. 2. Vliv koncentrací chlortetracyklinu na inhibici α-amylásy *A. oryzae* v acetátovém pufru pH 6,0. Osa x = čas v min., osa y = propustnost v %. pH roztoku 6,0, pufrováno acetátovým ústojem konečné koncentrace 0,1 M. I: kontrola a 400 μg, II: 600 μg, III: 800 μg, IV: 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml.



Obr. 3. Vliv koncentrací chlortetracyklinu na inhibici α-amylásy *A. oryzae* ve fosfátovém pufru pH 7,0. Osa x = čas v min., osa y = propustnost v %. pH roztoku 7,0, pufrováno fosfátovým ústojem konečné koncentrace 0,01 M. I: kontrola, II: 400 μg, III: 600 μg, 800 μg a 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml.



Obr. 4. Vliv pH na inhibici α-amylásy *A. oryzae* chlortetracyklinem. Osa x = hodnoty pH, osa y = % inhibice α-amylásy *A. oryzae* chlortetracyklinem. Pufrováno acetátovými ústoji konečné koncentrace 0,1 M. Konečná koncentrace chlortetracyklinu 2 . 10^{-3} M.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Inhibice je závislá na druhu použitého pufru a na pH roztoku. V acetátovém pufru o pH 6,0 (obr. 2) inhibuje chlortetracyklin v koncentraci nad $1,2 \cdot 10^{-3}$ M. Ve fosfátovém pufru o stejném pH inhibuje chlortetracyklin již v koncentraci $8 \cdot 10^{-4}$ M. Ve fosfátovém pufru při pH 7,0 a stejné koncentraci antibiotika je inhibice větší (obr. 1 a 3).

Inhibiční účinek chlortetracyklinu na dextrinaci škrobu se projevuje v acetátovém pufru od pH 4,8 výše (obr. 4).

Vliv vápníku na inhibiční účinek chlortetracyklinu

Je známo, že vápník je stabilisátorem pro α-amylásy. Prokázali jsme však, že inhibice α-amylásy za našich pokusných podmínek není způsobena odnímáním Ca^{++} z roztoku chlortetracyklinem. Ani velký přebytek vápníku (tab. 1) nezpůsobil podstatnou změnu v inhibiční činnosti chlortetracyklinu. Uvedené výsledky a skutečnost, že jsme ve všech pokusech používali dialysovaného enzymatického roztoku, dokazují, že inhibiční vliv chlortetracyklinu není způsobován odnímáním nízkomolekulárního stabilisátoru.

Tab. 1. Vliv Ca^{++} na inhibici α-amylásy chlortetracyklinem. Pufrováno acetátovým ústojem pH 5,6 konečné koncentrace 0,1 M.

Pokus č.	Konečná koncentrace		Jednotky α-amylásy
	chlortetracyklinu	$CaCl_2$	
1	$1,8 \cdot 10^{-3}$ M	$1,8 \cdot 10^{-2}$ M	0,84
2	$1,8 \cdot 10^{-3}$ M	$6 \cdot 10^{-3}$ M	0,74
3	$1,8 \cdot 10^{-3}$ M	—	0,45
4	—	$1,8 \cdot 10^{-2}$ M	3,30
5	—	$6 \cdot 10^{-3}$ M	3,50
6	—	—	3,50

Vliv některých organických kyselin na inhibiční účinek chlortetracyklinu

Již předešlé pokusy ukázaly (obr. 1 a 2), že inhibice α-amylásy, vyvolaná chlortetracyklinem, závisí na druhu přítomných aniontů. Jsou-li však přítomny anionty některých organických kyselin, na př. citronové nebo šťavelové v koncentraci $2 \cdot 10^{-2}$ M, dochází k úplnému odstranění inhibice. Anionty kyselin ftalové, benzoové, fumarové a vinné odstraňují inhibici neúplně, kyselin mléčné a propionové v acetátovém pufru neměly vůbec vliv na inhibici vyvolanou chlortetracyklinem

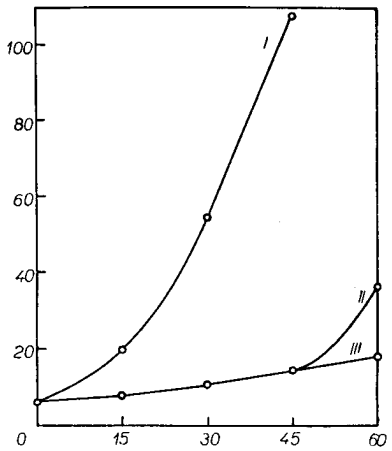
Tab. 2. Vliv některých organických kyselin na inhibici α-amylásy chlortetracyklinem
Pufrováno acetátovým ústojem pH 5,6, konečné koncentrace 0,1 M. Konečná koncentrace sodných solí kyselin $2 \cdot 10^{-2}$ M chlortetracyklinu $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Sodná sůl přidávané kyseliny	Jednotky α-amylásy			
	přídavek			
	O	kyseliny	chlortetracyklinu	chlortetracyklinu a kyseliny
šťavelové	3,79	3,83	0,28	3,68
citronové	3,82	3,69	0,25	3,28
ftalové	3,83	3,83	0,26	2,71
fumarové	3,83	3,83	0,28	1,54
benzoové	3,83	3,83	0,26	1,47
vinné	3,79	3,67	0,28	1,44
propionové	3,83	3,75	0,23	0,27
mléčné	3,83	3,83	0,23	0,23

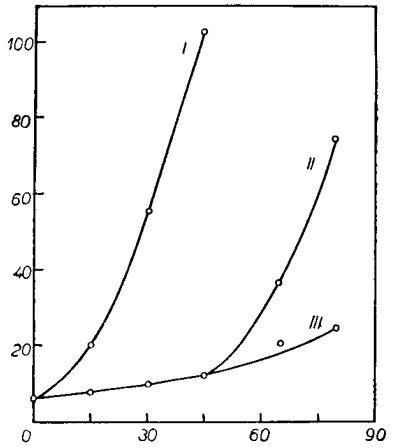
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

(tab. 2). Zjištěné skutečnosti nám daly podklad pro řešení další otázky, zda totiž inhibice aktivity α-amylásy, vyvolaná chlortetracyklinem, probíhá reversibilně nebo irreversibilně.



Obr. 5. Vliv následného přidání citrátu k α-amylase *A. oryzae* inhibované chlortetracyklinem. Osa x = čas v min., osa y = propustnost v %. pH roztoku 6,0, pufrováno acetátovým ústojem konečné koncentrace 0,1 M. I: kontrola, II: 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml, v 45. min. přidán 1 ml Na-citrátu (konečná koncentrace $2 . 10^{-2}$ M), III: 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml, ve 45. min. přidán 1 ml H_2O.



Obr. 6. Vliv následného přidání acetátu k α-amylase *A. oryzae* inhibované chlortetracyklinem. Osa x = čas v min., osa y = propustnost v %. pH roztoku 6,0, pufrováno fosfátovým ústojem konečné koncentrace 0,01 M. I: kontrola, II: 600 μg chlortetracyklinu v 1 ml, ve 45. min. přidán 1 ml Na-acetátu (konečná koncentrace $2 . 10^{-1}$ M), III: 600 μg chlortetracyklinu v 1 ml, ve 45. min. přidán 1 ml. H_2O.

Přídavek citrátu (acetátový pufr) nebo acetátu (fosfátový pufr) do reakční směsi, ve které byla α-amylása předem inhibována chlortetracyklinem, odstraňuje inhibici (obr. 5 a 6). Rychlost dextrinace škrobu po přidání těchto kyselin je stejná jako v nepřítomnosti chlortetracyklinu. Odstranění inhibice je tedy úplné. Uvedené výsledky svědčí o tom, že inhibice α-amylásy chlortetracyklinem je reversibilní.

Diskuse

Mimo studie o bakteriostatickém nebo bakteriocidním účinku antibiotik existuje řada prací, které se zabývají otázkou působení antibiotik na jednotlivé enzymatické systémy jak in vivo, tak in vitro (Agarwala a sp. 1952, Arora a sp. 1954, 1955a, b, Brody a sp. 1954, Ghatak a sp. 1953, Iyer a sp. 1953, Jacobson a sp. 1954, Loomis 1950, Saz a sp. 1954, Zimmerman a sp. 1953). Charakteristickým rysem těchto prací je, že se v nich používá nepoměrně vyšších koncentrací antibiotik, než při kterých se již projevují jejich bakteriostatické nebo bakteriocidní vlastnosti. Již tato okolnost nasvědčuje tomu, že v uvedených případech se projevuje vliv antibiotika na enzymatický systém nespecificky a je proto problematické vztahovat tyto výsledky k osvětlení změn enzymatických dějů při účinku antibiotik na množení mikroorganismů. I my jsme používali vysokých koncentrací chlortetracyklinu při studiu ovlivnění aktivity α-amylásy během dextrinace škrobu. Námi použité koncentrace jsou však aktuální při fermentaci *Actinomyces aureofaciens*, kde účinkem vysokého obsahu antibiotika může dojít k ovlivnění některých enzymatických systémů.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Naše pokusy dokazují, že vyšší koncentrace chlortetracyklinu inhibují dextrinační činnost α-amylásy *A. oryzae*. Je důležité, že tato inhibice se dá snadno odstranit některými organickými kyselinami, které však samy činnost studovaného enzymu neovlivňují. Tím je dána možnost prostudovat ovlivnění α-amylásy u *Actinomyces aureofaciens* během fermentace produkovaným chlortetracyklinem a v případě inhibice měřit obsah α-amylásy.

Van Meter a Oleson (1951) předpokládají, že chlortetracyklin brzdí některé reakce Krebsova cyklu, protože kyselina citronová odstraňovala inhibiční vliv chlortetracyklinu při studiu dýchání homogenátů krysích jater. Skutečnost, že též v našich pokusech kyselina citronová i jiné kyseliny odstraňovaly inhibiční vliv chlortetracyklinu na amylolytický enzymatický systém, nasvědčuje, že chlortetracyklin mohl účinkovat i na jiné systémy, souvisící s dýcháním jater.

V některých případech nižší koncentrace antibiotik aktivují činnost enzymů, při vyšších koncentracích ji však inhibují (Smith a sp. 1949). Je pravděpodobné, že to platí i pro vliv chlortetracyklinu na α-amylásu. Arora se spolupracovníky (1952) zjistili, že při nižších koncentracích chlortetracyklinu, než jsme používali my ve svých pokusech, dochází k aktivaci amylolytického systému sladu a plísní. Je však nutno zdůraznit, že tito autoři sledovali aktivitu amylolytického systému na základě zvýšení redukční mohutnosti. Tímto způsobem nevyloučili možnost účinku jiných enzymů, a to zejména maltásy.

Souhrn

Prokázali jsme inhibiční vliv chlortetracyklinu v koncentraci $8 \cdot 10^{-4}$ M a vyšší na dextrinační činnost α-amylásy plísně *Aspergillus oryzae* a studovali jsme vliv pH, Ca^{++} a některých organických kyselin na tuto inhibici.

Inhibice α-amylásy, vyvolaná chlortetracyklinem, se dá odstranit citrátem, oxalátem a jinými anionty organických kyselin. Inhibice α-amylásy je reversibilní.

Akademiku I. Málkovi a Dr J. Řičicovi děkujeme za zájem a připomínky při této práci.

Literatura

Agarwala, S. C., Krishna Murti, C. R., Shrivastava, D. L.: *Studies on enzyme inhibition in relation to drug action: I. Effect of certain antibiotics on urease.* J. Sci. industr. Res., 11 B : 165, 1952.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: *Studies on enzyme inhibition in relation to drug action: III. Action of certain antibiotics on amylases.* J. Sci. industr. Res., 11 B : 383, 1952.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: *Enzyme inhibition studies in relation to drug action: VI. Action of certain antibacterial agents on the succinic oxidase system.* J. Sci. industr. Res., 13 A : 482, 1954.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: *Studies on enzyme inhibition in relation to drug action: VII. Action of certain antibacterial agents on tryptophanase.* J. Sci. industr. Res., 14 C : 6, 1955a.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: *Enzyme inhibition studies in relation to drug action: VIII. Action of certain antibacterial agents on the tricarboxylic acid cycle of Vibrio cholerae.* J. Sci. industr. Res., 14 C : 66, 1955b.

Bělozerskij, A. N., Proskurjakov, N. J.: *Praktičeskoje rukovodstvo po biochimiji rastěnij.* Moskva 1951.

Brody, T. M., Hurwitz, R., Bain, J. A.: *Magnesium and the effect of the tetracycline antibiotics on oxidative processes in mitochondria.* Antibiot. Chemother., 4 : 864, 1954.

Burger, M., Beran, K.: *O mechanismu účinku maltásy plísně Aspergillus niger. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plísňovými enzymatickými preparáty.* Chem. listy, 50 : 133, 1956.

Van Dyck, P., De Sommer, P.: *Production and extraction methods of aureomycin.* Antibiot. Chemother., 2 : 184, 1952.

Ghatak, S., Krishna Murti, C. R.: *Enzyme inhibition studies in relation to drug action: IV. Action of certain antibiotics on alkaline phosphatase.* J. Sci. industr. Res., 12 B : 160, 1953.

Iyer, S. N., Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: *Studies on enzyme inhibition in relation to drug action: V. Effect of certain antibiotics on liver arginase.* J. Sci. industr. Res., 12 B : 536, 1953.

Jacobson, K. P., Deodata de Azevedo, M.: *Action of antibiotics on a peptidase and on urease.* Compt. Rend. Soc. Biol., 148 : 199, 1954.

Loomis, W. F.: *On the mechanism of action of aureomycin.* Science, 111 : 474, 1950.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Van Meter, J. C., Oleson, J. J.: *Effect of aureomycin on the respiration of normal rat liver homogenates.* Science, 113 : 273, 1951.

Saz, A. K., Slie, R. B.: *Reversal of aureomycin inhibition of bacterial cell-free nitro reductase by manganese.* J. Biol. Chem., 210 : 407, 1954.

Smith, G. N., Worrel, C. S., Swanson, A. L.: *Inhibition of bacterial esterases by chloramphenicol (chloromycetin).* J. Bact., 58 : 803, 1949.

Zimmerman, H. J., Humoller, F. L.: *Effect of aureomycin on choline oxidase and other enzyme systems of rat liver.* Am. J. Physiol., 175 : 468, 1953.

Влияние хлортетрациклина на активность α-амилазы

М. Бургер, И. Рокос и П. Прохазка

Резюме

Мы доказали задерживающее влияние хлортетрациклина, в концентрации $8 \cdot 10^{-4}$ M и выше, на декстринирующее действие α-амилазы плесени Aspergillus oryzae. Мы изучали влияние pH, ионов Ca^{++} и некоторых органических кислот на его задерживающее действие. Угнетающее действие хлортетрациклина на α-амилазу можно устранить с помощью цитрата, оксалата и других анионов органических кислот. Угнетение α-амилазы хлортетрациклином — явление обратимое.

The Influence of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase

M. Burger. J. Rokos and P. Procházka

Summary

The inhibitory influence of chlortetracycline in a concentration of 8×10^{-4} M and upwards on the dextrination activity of α-amylase of the mould Aspergillus oryzae was demonstrated and a study was made of the influence of pH, Ca^{++} and certain organic acids on this inhibition. Inhibition of α-amylase, produced by chlortetracycline, can be cancelled by citrate, oxalate and other anions of organic acids. Inhibition of α-amylase by chlortetracycline is reversible.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 1. (1956) — č. 3

Stav nevnímavósti v průběhu experimentální stafylokokové infekce. II.

JIŘÍ JOHANOVSKÝ

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 10. 10. 1955

V předchozím sdělení (Johanovský 1956 b) jsme publikovali výsledky získané při stafylokokové reinfekci u králíků, kterým bylo 24 hodin předem vstříknuto intravenosně přibližně 1/10 DLM stafylokokové kultury. Zjistili jsme, že tímto způsobem lze vyvolat stav relativní odolnosti a pokusili jsme se sledováním hladiny leukocytů a počtu mikrobů v krvi i orgánech určit její mechanismy.

Mohli jsme tímto způsobem rozlišit dva typy reakcí, vznikající v závislosti na tom, zda jsme použili k přípravné infekci buď velké dávky nevirulentní kultury nebo malé dávky virulentní infekce. V této práci chceme objasnit především několik otázek o specifičnosti a o účasti antitoxických mechanismů při obou typech reakcí.

Materiál a metody

K pokusům jsme použili především dvou kmenů stafylokoků (Wood A virulentní a Wood B nevirulentní) popsaných v naší první práci (Johanovský 1956 b); množství mikrobů jsme určovali fotometricky. Dále jsme použili blíže neurčených kmenů hemolytických streptokoků, pneumokoků a *Salmonella paratyphi* B. Zde jsme dávky určovali podle předběžné titrace letálnosti a kontrolovali fotometricky, avšak bez stanovení, jakému množství živých mikrobů užitá suspense odpovídá. Suspensi jsme připravovali vždy z 20hodinové kultury na pevných půdách, toliko u streptokoků použitých k vlastní (nikoliv přípravné) infekci jsme pracovali s 12hodinovou kulturou z bujonu, kultivovanou na třepačce.

Jako pokusných zvířat jsme použili králíků o váze 2—2,5 kg a v několika případech též morčat o váze 300 až 400 g. Počet mikrobů v krvi jsme určovali kvantitativně stejně jako v předchozí práci (Johanovský 1956 b). Bakteriemie byla v některých případech stejná u pokusných i kontrolních zvířat s rozdíly počtu mikrobů o 10 až 20 %. Jindy byl počet mikrobů v krvi u pokusných zvířat snížen přibližně na ¼ nebo ½ hodnot kontrol. Tyto výsledky uvádíme v tabulkách jen souhrnně, poněvadž byly obdobné jako v předchozí práci.

Změny antitoxické odolnosti jsme zjišťovali třemi způsoby: 1. titrací antitoxického účinku sera běžnou hemolytickou metodou (Vygodčikov 1950), 2. podle schopnosti organismu vázat toxin po intravenosním vstříknutí, což jsme zjišťovali určením volného toxinu v seru hemolytickou titrací za 10 minut po vstříknutí ½ DLM toxinu intravenosně králíkům, 3. určením smrtelné dávky toxinu u morčat, t. j. registrací doby smrti po různých dávkách toxinu intrakardiálně. Dále jsme určovali nekrotické a zánětlivé dávky toxinu při intradermálním vstříknutí různých ředění králíkům. Jako kontrolu specifičnosti jsme zjišťovali účinek difterického toxinu ředěného 1 : 1000, 10% roztoku $CaCl_2$ a koncentrovaného alkoholu, vstřikovaných intradermálně v dávkách po 0,2 ml. Všechny reakce jsme hodnotili za 24 a 48 hodin. Toxin jsme připravili kultivací mikrobů na celofánu (Johanovský 1956 c), jeho hemolytický titr byl 1 : 5120.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Výsledky

Specifičnost změn odolnosti po stafylokokové infekci

V prvých pokusech jsme zjišťovali, zda odolnost vyvolaná intravenosní stafylokokovou infekcí je specifická či ne. Výsledek pokusů uvádí souhrnně tabulka 1.

Tab. 1. Specifičnost změn vnímavosti organismu po předběžné stafylokokové infekci virulentní (Wood A) a nevirulentní (Wood B). Značka ž = trvale přežívá

Pokusné zvíře	Přípravná infekce	Vlastní infekce	Doba života ve dnech		Průběh bakteriemie
			pokusná zvířata	kontroly	
Králík	Wood A 20 mil	pneumokoky 1 ml	4 ž ž	5 ž	—
Králík	Wood A 40 mil	Para B 1 ml	1 1 2 4 ž	1 2 2	—
Králík	Wood A 10 mil	Para B 0,75 ml	2 2 4	2 3 3	—
Morče	Wood A 50 mil	streptokoky 2 ml	1 2 2 4 5	2 2 3 3 4	—
Králík	Wood B 100 mil	streptokoky 1 ml	2 4 4 ž	1 1 3	—
Králík	Wood B 200 mil	streptokoky 0,75 ml	3 6 ž	2 2 3	zvýšená očista
Morče	Wood B 400 mil	streptokoky 1,5 ml	2 4 5 6 ž ž	2 3 3 4	zvýšená očista

Tab. 2. Změny vnímavosti organismu k stafylokokové infekci po předběžné infekci jinými mikroby. Značka ž = trvale přežívá.

Pokusné zvíře	Přípravná infekce	Vlastní infekce	Doba života ve dnech		Průběh bakteriemie
			pokusná zvířata	kontroly	
Morče	pneumokoky 0,5 ml	Wood A 2 miliardy	2 2 2 3 3	1 2 2 4 ž	—
Morče	streptokoky 0,2 ml	Wood A 2 miliardy	1 1 2 3 4 4	1 1 2 4 4 6	—
Morče	streptokoky 0,3 ml	Wood A 3 miliardy	1 1 2 3 3 3	1 2 2 3 3	stejná
Králík	streptokoky 0,2 ml	Wood A 100 mil	18 21 30 hod.	18 20 29 hod.	stejná
Morče	streptokoky + bujon 0,5 ml	Wood A 3 miliardy	2 3 5 5 ž	1 2 2 2 3 3	zvýšená očista
Králík	streptokoky + bujon 0,5 ml	Wood A 3 miliardy	4 4 ž	1,5 3	zvýšená očista
Králík	bujon 0,5 ml	Wood A 200 mil	3 6 ž	1,5 3	zvýšená očista

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Ukázalo se, že malá dávka virulentní infekce kmene Wood A nezvýší odolnost vůči heterologní infekci; velká dávka nevirulentní infekce kmene Wood B zvýší odolnost vůči streptokokové infekci podobně jako proti reinfekci specifické a dochází při tom k rychlejší očistě krve od vstříknutých mikrobů.

V druhé řadě pokusů jsme zkoumali, zda přípravná infekce jinými mikroby vyvolá zvýšení odolnosti vůči následné infekci stafylokokové (tabulka 2). Nalezli jsme, že zatím co vstříknutí nevelkého množství pneumokoků nebo streptokoků nevyvolá zvýšenou obranu vůči letální dávce stafylokokové infekce, vzniká tato zvýšená odolnost tehdy, vstříkneme-li současně s těmito mikroby bujon nebo vstříkneme-li bujon samotný. Přitom se opět ukazuje zvýšená očista krve od mikrobů.

Při konfrontaci těchto výsledků s předcházejícími pokusy znovu zjišťujeme, že zde můžeme rozlišit dva různé typy reakcí. Specifické jsou změny po malé dávce virulentní infekce, nespecifické zvýšení odolnosti nastává po větší dávce infekce nevirulentní nebo po vstříknutí bujonu, v obou případech provázené urychlenou očistou krve od mikrobů.

Změny antitoxické odolnosti

V prvých pokusech jsme sledovali, jak předběžná příprava pokusných zvířat změní průběh letální stafylokokové intoxikace a ovlivní velikost akutně smrtící

Tab. 3. Vliv předběžné stafylokokové infekce virulentní a nevirulentní na odolnost organismu vůči letální intravenosní stafylokokové intoxikaci. Údaj doby smrti 8° znamená smrt do rána druhého dne. Značka ž = trvale přežívá

Dávka toxinu intrakardiálně v ml (1 : 5)	Doba smrti v minutách po vstříknutí toxinu			
	kontroly	příprava Wood A 80 mil	příprava Wood B 500 mil	příprava bujon 0,5 ml
0,7	2′ 4′	—	5′ 5′ 6′ 8′	4′
0,6	—	—	4′ 8° 8° ž	5′ 9′ 8°
0,5	3′ 4′ 5′ 7′	3′ 37′	7′ ž	5′ 9′ 8° 8°
0,4	3′ 5′ 7′ 18′ 120′	4′ 5′ 7′	90′ 8°	60′ ž
0,3	4′ 5′ 6′ 7′ 7′ 60′ 8°	5′ 7′ 9′ 60′	ž ž	8° 8° ž
0,25	12′ 60′ 60′	60′ ž	—	ž
0,2	60′ ž ž	ž	—	—
Akutně smrtící dávka	0,3 ml	0,3 ml	0,7 ml	0,5—0,6 ml

dávky toxinu. Jako přípravného podnětu jsme použili: a) virulentní infekce kmene Wood A v úměrné dávce, b) nevirulentní infekce kmene Wood B ve velké dávce, c) jako nespecifického kontrolního podnětu vstříknutí bujonu, vesměs provedených 24 hodin před vlastním pokusem. Souhrn výsledků ukazuje tabulka 3.

Po malé dávce virulentní infekce se odolnost vůči intoxikaci prakticky téměř nemění, zato vzniká její zvýšení po použití jak bujonu, tak především velké dávky nevirulentní infekce.

Podobného výsledku jsme dosáhli i pomocí dvou nepřímých metod, a to určením

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

antitoxických vlastností sera 20 hodin po přípravné infekci (tabulka 4) a určením množství volného toxinu v seru 10 min. po vstříknutí ½ DLM stafylokokového toxinu intravenosně (tabulka 5).

Tab. 4. Antitoxické vlastnosti ser králíků kontrolních a připravených předběžnou virulentní a málo virulentní infekcí

Předběžná příprava	Antitoxický titr sera				
Wood A 20 mil	1/24	1/32	1/32	1/32	j.
Wood B 200 mil	1/8	1/16	1/16	1/24	j.
Kontroly	1/24	1/24	1/32	j.	

Tab. 5. Určení cirkulujícího toxinu v krvi králíků pokusných a kontrolních 10 minut po vstříknutí ½ DLM stafylokokového toxinu intravenosně. V tab. uveden stupeň hemolysy 1% králičích krvinek za 1 hod. v termostatu.

Předběžná příprava	Hemolytický titr sera králíků							
	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 6	1 : 8	1 : 12	1 : 16
Wood A 20 milionů	++++	++++	+++	—	—	—	—	—
	++++	++++	+++	+	—	—	—	—
	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
Wood B 200 milionů	—	—	—	—	—	—	—	—
	++	—	—	—	—	—	—	—
	+++	+	—	—	—	—	—	—
	++++	+++	+	—	—	—	—	—
Kontroly	++++	++++	++	—	—	—	—	—
	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
	++++	++++	++++	+++	+	—	—	—

Po malé dávce virulentní kultury se ani nezvyšuje antitoxičnost sera, ani není, ve srovnání s kontrolami, změn v stupni toxemie po vstříknutí toxinu. Po velké dávce nevirulentní kultury dochází k malému zvýšení antitoxických schopností sera (pravděpodobně nespecifického charakteru) a úměrně k tomu ke snížení množství cirkulujícího toxinu při subletální intravenosní intoxikaci.

Z těchto pokusů lze uzavřít, že zatím co malá dávka virulentní infekce nemění antitoxickou odolnost pokusných zvířat, velká dávka nevirulentní infekce a podobně i vstříknutí bujonu ji zvyšuje.

Změny reakce na intradermální vstříknutí stafylokokového toxinu

Při zjišťování účinku stafylokokového toxinu intradermálně u králíků kontrolních a připravených předběžným vstříknutím malé dávky virulentní infekce, velké dávky nevirulentní infekce nebo bujonu jsme dosáhli těchto výsledků:

Po intravenosní stafylokokové infekci nevirulentním kmenem ve velké dávce a obdobně i po vstříknutí stafylokokové vakciny a bujonu dochází ke zvýšení odol-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Tab. 6. Vliv předběžné stafylokokové infekce velkou dávkou nevirulentní kultury na reakci organismu při intradermální stafylokokové intoxikaci. V tab. uvedeno pro jednotlivá zvířata nejmenší ředění toxinu, dávající nekrosu nejméně 5 × 5 mm

Přípravná infekce Wood B	Nejmenší nekrotická dávka toxinu			Reakce na nespecifické podněty
	kontroly	příprava bujon 0,5 ml	příprava infekce	
500 mil	1 : 30 1 : 30 > 1 : 30 1 : 100	1 : 10 1 : 10 1 : 10 > 1 : 10	< 1 : 10 1 : 10 1 : 10 1 : 30	snížená
(jen bujon)	1 : 80 > 1 : 80 > 1 : 80 1 : 160	1 : 40 1 : 40 >1 : 40 1 : 80	—	—
500 mil	1 : 100 1 : 100 > 1 : 100	—	1 : 30 1 : 30 1 : 30	snížená
vakcina 500 mil	1 : 40 1 : 80 1 : 80	—	< 1 : 20 1 : 20 1 : 20 1 : 20	—

nosti vůči intradermálně vstříknutému toxinu, t. j. k vyvolání nekrosy je třeba větších dávek toxinu (tabulka 6). Toto zvýšení odolnosti není specifické, neboť u těchto zvířat jsou menší rozsahem a intensitou i reakce vyvolané intradermálním vstříknutím difterického toxinu, alkoholu a $CaCl_2$ (tabulka 7).

Po malé dávce virulentní stafylokokové infekce kmene Wood A se mění vnímavost k intradermálnímu vstříknutí stafylokokového toxinu tak, že k nekrose dochází již při vyšších ředěních, t. j. při menším množství toxinu (tabulka 8). Tyto změny nevzniknou po použití vakciny a jsou specifické, reakce na jiné podněty je stejná jako u kontrol (tabulka 7). Přitom jsme ve všech pokusech viděli, že je současně zmírněn rozsah a intensita zánětlivých reakcí na vstříknuté malé dávky toxinu. Ve zvláštním pokusu jsme použili pouze těchto nevelkých dávek vyvolávajících zánětlivou odpověď bez nekrosy; výsledek jsme zcela jasně potvrdili (tabulka 9).

Shrnujeme, že jsme v těchto pokusech prokázali, že po velké dávce nevirulentní stafylokokové kultury, vakciny nebo po bujonu se nespecificky zvyšuje odolnost vůči intradermálnímu vstříknutí stafylokokového toxinu. Po vstříknutí malé dávky virulentní infekce dojde ke změnám specifickým, které se projeví jednak snížením zánětlivých reakcí vyvolaných malými dávkami toxinu, jednak zvýšením nekrotických reakcí po vstříknutí stafylokokového toxinu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Tab. 7. Změny vnímavosti na nespecifické podněty po předběžné stafylokokové infekci malou dávkou virulentní a velkou dávkou nevirulentní stafylokokové kultury. Výklad symbolů: N = nekrosa, R, r = erythem, I, i = infiltrát podle intensity, číselný údaj znamená velikost v mm. Shodné výsledky byly získány celkem na 13 králících kontrolních a 23 pokusných

Nespecifický podnět	Reakce za 24 hod. u skupin zvířat		
	kontroly	příprava Wood A 20 mil	příprava Wood B 200 mil
Difterický toxin 1 : 1000	N 12 RI 18 N 12 RI 20 N 10 RI 20	N 10 RI 20 N 10 RI 18 N 12 RI 18	N 6 RI 12 N 4 RI 10 N 4 RI 12
Alkohol 0,1	N 20 N 18 N 25	N 20 N 20 N 22	N 10 N 12 N 8
$CaCl_2$ 10 %	RI 15 Ri 15 Ri 12	Ri 15 RI 12 RI 15	r 8 ri 10 r ±

Tab. 8. Vliv předběžné stafylokokové infekce malou dávkou virulentní kultury na odpověď organismu při intradermální stafylokokové intoxikaci. V tab. uvedeno pro jednotlivá zvířata nejmenší ředění toxinu, které vyvolá nekrosu nejméně 5 × 5 mm

Přípravná infekce Wood A	Nejmenší nekrotická dávka toxinu		Reakce na nespecifické podněty
	pokusní králíci	kontroly	
20 mil	1 : 120 1 : 120 1 : 120 1 : 180 > 1 : 180	1 : 45 1 : 45 1 : 60	—
20 mil	1 : 150 1 : 200 1 : 200 1 : 300	1 : 50 1 : 75 1 : 75	—
40 mil	1 : 160 1 : 160 > 1 : 160 1 : 320	1 : 80 > 1 : 80 > 1 : 80 1 : 160	nezměněná
20 mil	1 : 40 1 : 160 1 : 160 1 : 160 1 : 320 1 : 320	1 : 80 1 : 80 1 : 80	nezměněná
Vakcina 40 mil	1 : 80 1 : 80 1 : 80 1 : 80	1 : 40 1 : 80 1 : 80	—

Tab. 9. Změny vnímavosti k malé dávce stafylokokového toxinu intradermálně a jejich specifičnost po předběžné infekci malou dávkou (20 milionů) stafylokokové kultury Wood A. Pro stafylokokový toxin uvedeny výsledky jednotlivých zvířat, u nespecifických podnětů průměr výsledků celé skupiny. Výklad symbolů v tab. 7

	Pokusná zvířata	Kontroly
Stafylokokový toxin 1 : 160	± r ± 10 r ± 6 ± ± ri 10	RI 25 RI 25 RI 20
Stafylokokový toxin 1 : 320	— — ± — — —	ri 12 Ri 12 RI 15
Difterický toxin 1 : 1000	N 12 RI 20	N 11 RI 20
Alkohol	N 21	N 22
$CaCl_2$ 10 %	Ri 12	Ri 14

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Diskuse

V této práci jsme získali výsledky, které doplňují naše předešlé sdělení a můžeme proto obě shrnout v celek. Po přípravné intravenosní stafylokokové infekci vznikají změny reakce organismu, které mohou mít dvojí různý charakter.

1. Prvý typ reakce vzniká po vstříknutí větších dávek málo virulentní infekce nebo po velké dávce stafylokokové vakciny; analogické změny nastávají i po vstříknutí bujonu. Tento typ reakce se projevuje zvýšenou odolností vůči infekci různými mikroby, spojenou se zvýšenou očistou krve, dále zvýšením antitoxických mechanismů a odolnosti vůči letálnímu účinku stafylokokového toxinu, zvýšenou odolností vůči stafylokokovému toxinu a jiným dráždivým látkám vstříknutým intradermálně. Jde zřejmě o známou nespecifickou reakci, která nastává v organismu při styku s cizorodým antigenním podrážděním.

2. Druhý typ reakcí vzniká po vstříknutí nevelké dávky virulentní stafylokokové kultury, nevzniká však po analogické dávce málo virulentních mikrobů ani po příslušné vakcině, při čemž vyvolané změny jsou specifické. Při intravenosní stafylokokové reinfekci obsahuje krev a orgány stejné množství mikrobů a hladina leukocytů probíhá podobně jako u kontrol, avšak pokusná zvířata přežívají, kontrolní hynou. Tento typ ochrany nevzniká po přípravné stafylokokové infekci vůči reinfekci jinými mikroby a stejně tak po přípravné heterologní infekci nevzniká vůči reinfekci stafylokokové. Zvýšená odolnost není spojena s žádnými projevy jakýchkoliv antitoxických mechanismů a reakcí. Při intradermálním vstříknutí stafylokokového toxinu vznikají nekrotické reakce rozsáhlejší a již po menších dávkách toxinu než u kontrol; současně je snížena intensita a rozsah zánětlivých změn po malých dávkách toxinu. I tyto změny jsou specifické, uplatňující se jen vůči stafylokokovému toxinu.

Zdánlivě protichůdný výsledek při intradermálním vstříknutí toxinu je možno vysvětlit velmi dobře na základě našich starších prací o mechanismech mikrobních intoxikací (Johanovský 1956 a). Prokázali jsme tehdy podle histologického obrazu i podle biologických odpovědí organismu, že zánětlivá reakce a nekrosa vyvolaná stafylokokovým toxinem jsou dvě reakce základně odlišného typu. Nekrosa vzniká přímým účinkem stafylokokových toxinů, enzymů atd., zánět po vstříknutí menších dávek toxinu představuje odpověď organismu jako celku za pravděpodobné účasti reflexních mechanismů.

Všechny podmínky, které potlačují a zeslabují obrannou zánětlivou reakci (útlum větším množstvím současně vstříknutého toxinu, narkotický spánek, rané stadium ontogenesy) vedou současně k větší možnosti bezprostředního účinku stafylokokového toxinu a tím k zintensivnění nekrotických reakcí. K podobným závěrům o vlivu zánětu na účinek stafylokokového toxinu dospěl na základě jiného pokusného materiálu i Kenton (1939).

Náš výsledek v těchto pokusech lze plně vyložit tím, že vlivem předběžné infekce dochází k zeslabení zánětlivých reakcí po vstříknutí toxinu a tím k častějšímu a většímu vzniku nekros. Prvotní změnou je tedy snížená odpověď organismu na přítomnost vstříknutého toxinu. Přitom zánětlivé i nekrotické reakce na ostatní podněty (difterický toxin, $CaCl_2$, alkohol) jsou zachovány v normálním rozsahu jako u kontrol, jde tedy o změnu specifickou vůči stafylokokovému toxinu.

Tento výsledek ukazuje podobnost s odolností pozorovanou při intravenosní reinfekci. V obou případech dochází k takovým stavům, že organismus nereaguje na přítomnost patologického dráždítele (toxinu nebo mikrobů) obvyklým způsobem, že přípravná infekce jej změnila v tom smyslu, že určité množství patologických podnětů působí na něj slaběji, aniž by bylo možno prokázat odpovídající obrannou reakci.

Pokud jde o podstatu těchto změn, nabízí se přímo použití výrazu nevnímavost v podobném smyslu jako Speranského (1952, 1953) pojem „neonemocnění", Adova (1952) patogenetická imunita a podobně. Je třeba však zdůraznit, že tyto pojmy bez podrobné analysy konkretních mechanismů v každém jednotlivém případě nic nevysvětlují, mohou pouze souhrnně označovat určité jevy nebo úvahové představy.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Že v průběhu infekčních a toxických procesů dochází ke změnám vnímavosti a citlivosti na příslušné antigeny, lze doložit zcela bezpečně. Jde o celou řadu nálezů od známých prací Adových (1951, 1952), Raškové (1952—1955) a j. krůzným empirickým zkušenostem klinickým i experimentálním, jak jsme je i s vlastními doklady shrnuli v dřívějších práci (Johanovský 1956a). Je nutno brát v úvahu i řadu jiných, většinou nespecifických změn nastávajících v organismu pod vlivem infekce nebo vpravení cizorodých antigenů, jako jsou změny vyšší nervové činnosti (Gorševeva 1953, Kotljarevskij 1953, Vygodčikov 1955 a j.), změny vegetativního nervového systému (Hoff 1944, Serova 1953, Ganjušina 1953, Bezuglov a Brainina 1955), hormonální (Westphall, Lüderitz a Keiderling 1952, Mašlinski 1954, Frimmer 1953), metabolické (Waniek 1940, Westphall 1955), změny teplotní regulace (souhrnně viz Šterzl 1956), mesenchymální tkáně (Favilli a McClean 1937, Vuchert 1953, Aga Zade a Nasrullaeva 1954 a j.). Na všechny tyto možnosti a konfrontace s nimi by bylo nutno myslet při každém pokusu o výklad mechanismu našich výsledků.

Změny odolnosti na začátku a v průběhu infekčního procesu byly popisovány, ovšem bez jakékoliv analysy, již od nejstarších dob mikrobiologie a imunologie (Denys a Lecleff 1895 a j.). Troickij (1950) uvažuje o jejich vztahu k mechanismu účinku živých vakcin. Nejnověji se otázkou nesterilní imunity u experimentální infekce *S. typhi* u myšek zabývala Sviridova (1955). V souboru několika prací došla k závěrům, že po vstříknutí malé infekční dávky nastupuje rychle relativně dobrá odolnost, specificky vázaná na antigenní strukturu použitých mikrobů. Slabší nespecifická odolnost vzniká i po infekci *E. coli*, nevzniká však po vstříknutí vakciny místo živé infekce. Dobrá odolnost (přežívání několika smrtelných dávek) není provázena schopností eliminovat vstříknuté mikroby z vnitřních orgánů; tento imunitní mechanismus se objevuje až daleko později při vzniku sterilní imunity postinfekční. Někteří pracovníci francouzské školy navrhovali pro tyto a podobné stavy především u tuberkulosy, ale i u jiných nemocí, název premunita (Sergent a Parrot 1935, Sergent 1950). Rychlé změny odolnosti v průběhu infekce mohou mít někdy značný význam a dosah, jak ukazuje tento příklad: při experimentální chřipkové infekci myšek v nesmrtící dávce se virus pomnoží v plicích v prvých 1—2 dnech na více než několik desítek smrtelných dávek schopných infikovat a usmrtit normální myšky; v nakaženém organismu toto velké množství viru nevyvolává zvláštních reakcí a patologických změn (Bieling 1944).

Výsledky obdobné našim byly popisovány i mimo rámec představ a pokusů směřujících k opakování výsledků Morgenrothových ve dvacátých letech. Bernheimer a Cantoni (1947) popsali, že 24 hodin po vstříknutí malé dávky streptolysinu nastává u pokusných zvířat specifická a nikoliv protilátková odolnost vůči smrtelné dávce téhož jedu. Jiným příkladem jsou i změny odolnosti nastupující do 24 hodin i dříve po aplikaci specifické vakciny nebo anatoxinu, opět bez účasti protilátek. Tyto změny byly popsány několikráte pro intoxikaci tetanickou (Raynaud a Wright 1953, Goldman, Turner a Stafford 1954, Lemetayer a j. 1950 a 1954), experimentální infekci rickettsiemi (Price, Johnson, Emerson a Preston 1954) a *H. pertussis* (Evans a Perkins 1954). Na základě našich pokusných výsledků podobného směru (Johanovský 1956a) i z rozboru prací výše uvedených lze dnes přesvědčivě doložit, že při výkladu těchto jevů nelze vystačit s předpokladem o mechanické interferenci na vnímavých strukturách buněčných, jak činí tito autoři na podkladě analogie s interferencí virovou. Skutečná podstata této rychlé adaptační reakce organismu zůstává však, podobně jako tyto naše výsledky, dosud nevysvětlitelná.

Souhrně lze říci, že jsme jasně prokázali vznik specifické odolnosti vůči infekci, kterou nelze vyložit běžnými antimikrobními (fagocytárními) nebo antitoxickými obrannými reakcemi, že však nelze kromě více či méně opodstatněných dohadů dosud nic říci o její podstatě a mechanismech. Zůstává zde otevřena řada dalších otázek, na příklad rozdílu mezi nevnímavostí vůči intravenosní infekci a nezvýšenou odolností vůči celkové intoxikaci, svědčící pro možnost dvou odchylných mechanismů, přesněji řečeno pro to, že o osudu infekce rozhodují ještě jiné faktory ovlivňující organismus jako celek, než toliko přímý účinek stafylokokového toxinu na srdce (Kellaway, Burnet a Williams 1930, Enikeeva 1952) a plicní cévy (Kellaway a j. 1930, Málek 1954).

Další perspektivní myšlenkou je původní názor Morgenrothův (1920, 1921), později popíraný (Philipson 1937, Krylov 1947, Sviridova 1955 a j.), že přípravná infekce vede k takovým změnám tkání organismu, že mikroby vpravené do nevnímavého organismu při reinfekci ztrácejí virulenci (odtud název „depresivní" imunita). V tom by mohlo být nalezeno vysvětlení, proč stejné množství mikrobů účinkuje kvantitativně méně patogenně u připravených zvířat než u kontrol. Opodstatnění nalézá tento názor v určitých jevech s druhé strany, t. j. v možnosti zvyšovat virulenci stafylokoků za určitých stavů tkání organismu, především zánětu

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

(Kourilsky a Mercier 1941), stejně jako v obdobných úvahách Planelesových (1955). Tyto otázky bude třeba řešit ovšem nikoliv úvahově, nýbrž experimentálně.

Druhý komplex otázek představuje vzájemný poměr obou typů reakcí po různě silné přípravné infekci. Celkem snadno lze vyložit vznik reakce typu „popudové terapie" po vstříknutí většího počtu mikrobů málo virulentních nebo i usmrcené vakciny. Jde o nespecifickou reakci, jak je známa i po aplikaci různých jiných bílkovinných látek.

Vznik reakce druhého typu, t. j. nevnímavosti bez antitoxických a antimikrobních mechanismů po infekci malou dávkou virulentních mikrobů nelze zatím vyložit. Je třeba zde upozornit, že výraz „malá dávka infekce" nesmí klamat v tom smyslu, jako by šlo o podnět pro organismus slabší; podle pokusů se stanovením bakteriemie po přípravné infekci lze soudit, že celkové množství mikrobů v časovém průřezu je u t. zv. malé dávky virulentní infekce při nejmenším stejné, jako po vstříknutí velké dávky infekce nevirulentní, rychle z organismu vylučované. Nadto přistupují u virulentní kultury další faktory jako hlubší zasahování do metabolismu tkání, jimiž jsou mikroby vychytávány, větší možnost tvorby toxických látek in vivo a pod.

Otázkou zůstává, proč tyto jistě silné podněty nevedou v infikovaném organismu k aktivní obranné odpovědi prvého typu. Možná, že právě pro toxický účinek metabolických produktů virulentní kultury, zachycující se a množící se v organismu, je obranná adaptační reakce mesenchymální tkáně zpožděna nebo zeslabena. Nelze ani vyloučit, že k zvýšené očistě mikrobů vstříknutých při reinfekci alespoň někdy a do jisté míry dochází, že je to však maskováno přetrvávající přítomností mikrobů z přípravné infekce. Ovšem na základním jevu, t. j. slabším patologickém účinku ve srovnání s kontrolami při stejném množství mikrobů v krvi a orgánech to vůbec nic nemění.

Nakonec je třeba zdůraznit, že jsme sice sledovali oba typy reakcí při pokusech na zvlášť vybraných typech virulentní a nevirulentní kultury jako by šlo o reakce oddělené a nezávislé, že jsme však naprosto přesvědčeni o jejich vzájemném vztahu a společném uplatnění v normálních podmínkách styku organismu s nákazou. Viděli jsme v pokusech s reinfekcí různě virulentními kmeny (prvé sdělení), že oba mechanismy mohou spolupůsobit a doplňovat se a že se vyskytují přechodné formy obou typů reakcí. Nadto je třeba uvážit, že druhý typ reakce (nevnímavost při stejném počtu mikrobů) nastává ve většině našich pokusů jistě i proto, že přípravná infekce vpravena do organismu intravenosně působí jistě slabší podnětovou reakci než jakýkoliv jiný způsob. Při vstříknutí mikrobů podkožně, intraperitoneálně nebo při přirozeném vniknutí dochází bezprostředně k zánětu a výrazným změnám tkáňovým i celkovým (Menkin 1948, Protopopov 1950, Šur 1953), což vše je spojeno jistě s nespecifickou mobilisační reakcí organismu. Právě proto jsme snad v dřívějších pokusech (Johanovský 1956 a) viděli za 24 hodin po stafylokokové infekci subkutánní nebo intradermální vznik odolnosti vůči letální intoxikaci, kdežto v nynějších pokusech po infekci intravenosní nikoliv.

Z těchto dokladů i ze základního pojetí organismu jako jednotně řízeného celku vyplývá, že by bylo chybné usuzovat z našich výsledků na dva obranné mechanismy, nastupující a střídající se alternativně podle různých podmínek. Své výsledky shrnujeme tak, že spolu s klasickými obrannými mechanismy antimikrobními a antitoxickými existují ještě jiné, zatím blíže neurčené specifické adaptační reakce, zvyšující biologickou odolnost organismu vůči infekci. Sledování těchto změn se nám zdá jednou z perspektivních cest k poznání fysiologických základů imunitních procesů.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Souhrn

1. Podrobili jsme další analyse dva typy reakcí nastupující po přípravné infekci různě virulentními stafylokokovými kmeny.

2. Jeden typ zvýšení odolnosti je nespecifický a je provázen antimikrobními a antitoxickými obrannými reakcemi.

3. Při druhém typu reakce probíhá infekce ve své mikrobní stránce kvantitativně stejně jako u kontrol, avšak s menším patologickým a letálním účinkem. Celková antitoxická odolnost není zvýšena, při místním účinku toxinu nacházíme slabší zánětlivé odpovědi organismu a tím zvýšený bezprostřední nekrotický účinek. Všechny tyto změny vnímavosti organismu jsou specifické.

4. Probrali jsme otevřené otázky a možný biologický význam těchto reakcí.

Za technickou spolupráci děkuji M. Buriánové a J. Krtičkové.

Literatura

Ado, A.D.: *Učenije I. P. Pavlova i sovremennaja immunologija.* Sborník *Učenije I. P. Pavlova v teoretičeskoj i praktičeskoj medicine.* Moskva 1951.

Ado, A. D.: *Antigeny kak črezvyčajnije razdražiteli nervnoj sistemy.* Moskva 1952.

Aga-Zade, A. B., Nasrullaeva, Ch. K.: *Izmenenije rychloj podkožnoj soedinitel'noj tkani pri immunizaciji protiv bakterial'noj dizenteriji u normal'nych i u golodajuščich krolikov.* Arch. patol. 16, (1), 1954.

Bernheimer, A. W., Cantoni, G. L.: *The toxic action of preparations containing the oxygen-labile haemolysin of Streptococcus pyogenes. III. Induction in mice of temporary resistence to the lethal effect of the toxin.* J. exp. Med. 86 : 193, 1947.

Bezuglov, V. P., Brajnina, E. S.: *Biologičeskije aktivnyje veščestva v krovi bolnych skarlatinoj.* ŽMEI (5), 1955.

Bieling, R.: *Die biologische Infektionsabwehr des menschlichen Körpers.* Wien 1944.

Bordet, J.: *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses.* Paris 1939.

Denys, J., Lecleff, J.: *Sur le méchanisme de l'immunité chez le lapin vacciné contre le streptocoque pyogène.* La Cellule 10 : 175, 1895.

Enikeeva, S. I.: *K charakteristike stepeni toksičnosti stafilokokkovovo toksina i ustojčiosti k nemu izolirovannovo serdca v različnyje vozrastnyje periody.* Zabolevanije, lečenije i vyzdorovlenije. Moskva 1952.

Evans, D. G., Perkins, F. T.: *Interference immunity produced by pertussis vaccine to pertussis infection in mice.* Brit. J. Exp. Path. 35 : 603, 1954.

Favilli, G., McClean, D.: *The influence of tissue permeability on local immunity.* J. Path. Bact. 45 : 661, 1937.

Fitch, F. W., Barker, P., Soules, K. H., Wissler, R. W.: *A study of antigen localisation and degradation and the histological reaction in the spleen of normal, x-irradiated and spleen shielded rats.* Lab. Clin. Med. 42 : 548, 1953.

Frimmer, M.: *Die Nachweis von Reaktionen an retikuloendothelialen System nach Injektionen von Omnadin und Pyrifer durch laufende Messung der Polyphosphoclearence.* Zschr. Immunitätsforsch. 110 : 436, 1953.

Ganjušina, E. Ch.: *Fazi i periody infekcionnovo processa v svete učenija I. P. Pavlova.* Žurn. vysš. nerv. dej. 3 : 836, 1953.

Goldman, L., Turner, T. B., Stafford, E. S.: *Protective action of tetanus toxoid unrelated to active immunisation in mice.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86 : 545, 1954.

Goršeleva, L. C.: *Narušenija vysšej nervnoj dejatelnosti, vyzvannyje povtornym vvedenijem stafilokokkovovo toksina u životnych (belych krys).* Žurn. vysš. nerv. dej. 3 : 416, 1953.

Hoff, H.: *Das vegetative Nervensystem im Rahme der gesamten vegetativen Steuerung.* D. med. Wochenschr. 87, (7—8), 1944.

Johanovský, J.: *Reaktivita organismu při infekci a intoxikaci.* Rozpravy ČSAV 1956 a, (v tisku).

Johanovský, J.: *Vznik nevnímavosti v průběhu experimentální stafylokokové infekce.* I. Čs. mikrobiologie 1 : 16, 1956 b.

Johanovský, J.: *Příprava stafylokokového anatoxinu kultivací na celofánu.* Čs. epid. mikrob. 4 : 165, 1956 c.

Kellaway, C. H., Burnet, F. M., Williams, F. E.: *The pharmacological action of the exotoxin of Staphylococcus aureus.* J. Path. Bact. 33 : 889, 1930.

Kenton, H. B.: *The influence of inflammation on the skin necrotizig action of staphylococcus toxin.* Am. J. Path. 15 : 185, 1939.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Kotljarevskij, L. I.: *Narušenija vysšej nervnoj dejatelnosti toksičeskovo proischoždenija u životnych i eksperimentalnaja terapija.* Sborník *Učenije I. P. Pavlova v teoretičeskoj i praktičeskoj medicine.* II., Moskva 1953.
Kourilsky, R., Mercier, P.: C. R. Soc. Biol, 135 : 16, 159, 803, 1267, 1270, 1421, 1424, 1941.
Krylov, V. N.: *Depressionnyj immunitet (po Morgenrothu) v experimente.* ŽMEI (2), 1947.
Lemetayer, E., Nicol, L., Girard, S., Chervazier, N., Cheyroux, D.: *Récherches expérimentales sur les interactions du sérum, de l'anatoxine, de toxine spécifiques et des tissues dans le traitment préventif et curatif de l'intoxication tétanique.* An. Inst. Pasteur 79 : 672, 1950.
Lemetayer, E., Raynaud, M., Nicol, L., Turpin, A.: *Action préventive précoce de l'anatoxine tétanique employée à doses massives.* Ann. Inst. Pasteur 87 : 1, 1954.
Málek, P.: *Nitrotepenné podávání penicilinu.* Thomayerova sb. 334, 1954.
Mašlinski, Cz.: osobní sdělení na imunologické konferenci v Liblicích 1954.
Menkin, V.: *Dinamika vozpalenija.* Ruský překlad, Moskva 1948.
Menkin, V.: *Newer concepts of inflammation.* Springfield 1948.
Morgenroth, J., Biberstein, H., Schnitzer R.: *Die Depressionsimmunität. Studien über Superinfektion mit Streptokokken.* D. med. Wochenschr. 40 : 337, 1920
Morgenroth, J., Abraham, L.: *Depressionsimmunität bei intravenöser Superinfektion mit Streptokokken.* Zschr. Hyg. Infkr. 94 : 163, 1921.
Philipson, J.: *Experimental studies on enhanced resistence to infection following some non specific measures.* Acta path. micr. Scand., supl. 32, 1937.
Planeles, Ch. Ch.: *Ob endogennych faktorach patogeneza bakterialnych infekcij.* ŽMEI (2), 1955.
Price, W. H., Johnson, W. J., Emerson, H., Preston, C. E.: *Rickettsial interference phenomen—a new protective mechanism.* Science 120 : 457, 1954.
Protopopov, S. P.: *Patogenez i lečenije dliteľno ne zaživajuščich ran.* Moskva 1950.
Rašková, H., Raška, K., Matějovská, V., Rybová, B.: *Některé vlastnosti toxinu Sh. shigae.* ČLČ 91 : 612, a 91 : 1348, 1952.
Rašková H., Raška K., Matějovská V., Rybová B.: *Některé vlastnosti tyfového endotoxinu.* Čs. hyg. epid. mikrob. 4 : 450, 1956.
Raynaud, M., Wright, E. A.: *Rapid specific preventive action of tetanus toxoid.* Nature 171 : 4357, 1953.
Sergent, E., Parrot, L.: *Immunité et prémunition.* Ann. Inst. Pasteur 55 : 385, 1935.
Sergent, E.: *Définition de l'immunité et de la prémunition.* Ann. Inst. Pasteur. 79 : 786, 1950.
Serova, N. I.: *Funkcionalnoje sostojanije i morfologičeskije izmenenija vagosimpatikusa pri experimentalnoj angine.* Bjull. eksp. biol. med. 37, (4), 1953.
Speranskij, A. D.: *Vvedenije.* Zabolevanije, lečenije i vyzdorovlenije, 1952.
Speranskij, A. D.: *Borba s virchowianstvom v biologii i medicine.* Sborník *Učenije I. P. Pavlova v teoretičeskoj i praktičeskoj medicine.* II, 1953.
Sviridova, T. A.: *O prirode immuniteta pri brjušnom tife.* Voprosy aktivnoj immunizaciji protiv. kišečnych infekcij. Moskva 1955.
Šterzl, J.: *Dlouhodobá imunisace II. Změny v peritoneálním exsudátu, reakci leukocytární a teplotové.* Čs. mikrobiologie 1, 1956 (v tisku).
Šur, E. I.: *Dejstvije nespecifičeskich razdražitelej na refleksi z interoreceptorov pri aseptičeskom vozpaleniji.* Bjull. eksp. biol. med. 37, (6), 1953.
Troickij, V. L.: *Prenija.* Problemy immuniteta i grippa, 1950.
Vuchert, A. M.: *Izmenenija rychloj soedinitelnoj tkani pri sensibilizaciji.* Arch. patologii 15, (4), 1953.
Vygodčikov, G. V.: *Mikrobiologija i immunologija stafilokokkovych zabolevanij.* Moskva 1950.
Vygodčikov, G. V.: *O nekotorych diskussionnych voprosach sovremennoj immunologiji.* ŽMEI (2), 1955.
Waniek, H.: *Experimentale Untersuchungen über die Beeinflussung der Lebertätigkeit durch Gonokokkenimpfstoffe.* Zschr. Immunitätsforsch. 98 : 186, 1940.
Westphall, O., Lüderitz, O., Keiderling, W.: *Über die Wirkungsweise bakterieller Reizstoffe.* Zbl. Bakter. I. 158 : 152, 1952.
Westphall, O.: *Zur Chemie und Wirkungsweise pyrogener Reizstoffe.* Acta neurovegetativa 11 : 126, 1955.

Состояние невосприимчивости в течение элспериментальной стафилококковой инфексии. II.

Ю. Йогановский

Резюме

Мы подвергли анализу два типа реакций, наблюдающихся после подготовительной инфекции штаммами стафилококка различной степени вирулентности. Один тип повышения устойчивости оказывается неспецифическим и сопровождается антимикробными и антитоксическими защитными реакциями. При втором типе реакции инфекция, что касается количества

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

микробов, протекает так же, как и в контроле, но не со столь значительным патологическим и летальным действием. Общая антитоксическая устойчивость не повышается. При местном воздействии токсина наблюдается более слабая воспалительная реакция и вследствие этого повышение непосредственно некротического действия токсина. Все эти изменения чувствительности организма являются специфическими. Мы рассматриваем вопросы, остающиеся открытыми, и возможное биологическое значение этих реакций.

The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection. II.

J. Johanovský

Summary

A further analysis was made of the two types of reaction occurring after a preparatory infection with staphylococcal strains of varying virulence. One type of increased resistance is non-specific and is accompanied by antibacterial and antitoxic defence reactions. In the second type of reaction, the course of the infection is the same as in the controls as regards number of bacteria, however, with a decreased pathological and lethal effect. General antitoxic resistance is not increased, the local action of toxin produces a weaker inflammatory response in the organism and in this way the direct necrotic effect is increased. All these changes in the sensitivity of the organism are specific. The unexplained problems and possible biological significance of these reactions are discussed.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 3

Vliv nedostatku a nadbytku bílkovin v potravě na imunitní odpověď. II.

Dlouhodobé vystavení dietám

ZDENĚK TRNKA*)

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha
Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

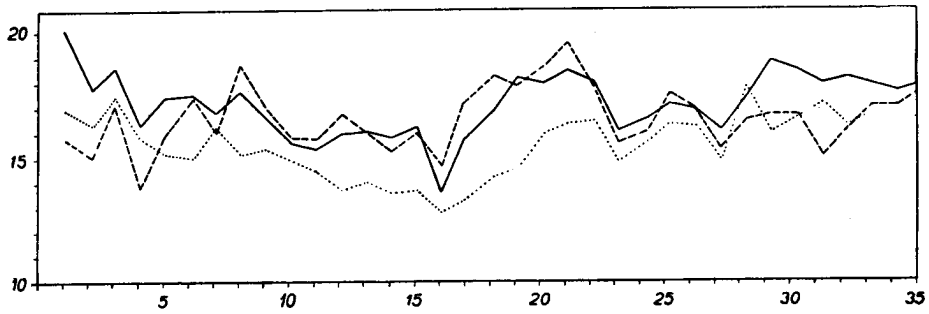
Došlo 22. 11. 1955

V prvním sdělení jsme ukázali (Trnka 1956), že krátkodobé podávání diet s nadbytkem a nedostatkem bílkovin ovlivnilo řadu imunologických reakcí. V diskusi jsme upozornili, že většina prací se zabývala sledováním působení krátkodobého podávání pokusných diet. Pouze ojedinělé práce sledovaly dlouhodobé působení diet na tvorbu protilátek (Wissler, Woolridge, Steffee a Cannon 1946, Wissler, Woolridge a Steffee 1946). Z těchto prací vyplývá, že po dlouhodobém podávání nízkobílkovinných diet zůstává snížena tvorba protilátek. V ojedinělých klinicko-experimentálních pracích s nemocnými s výživovou kachexií při různých chorobách (Bieler, Echer a Spies 1947, Balch 1950) nacházíme naopak údaje o normálních serologických vlastnostech a dokonce o zvýšené protilátkové reakci na antigenní podnět.

Klademe si v této práci za úkol zjistit účinek dlouhodobého podávání nízkobílkovinné, bílkovinami vyvážené a vysokobílkovinné diety na některé imunologické reakce, u kterých krátkodobé podávání vyvolalo významné rozdíly.

Materiál a metody

Do pokusu jsme vzali 90 rostoucích krysích samců kmene Wistar (chov farmy ČSAV) ve stáří 3 měsíců o průměrné váze 250 gramů. Od odstavení až do nasazení pokusných diet byly krysy krmeny standardní Larsenovou dietou. Rozdělení do tří skupin, chování krys v pokuse, jakož i složení a podávání diet



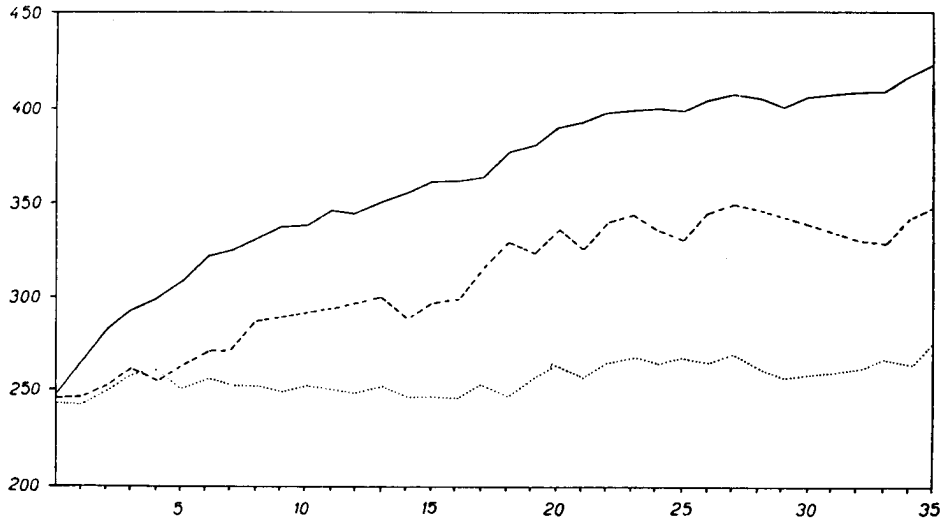
Obr. 1. Denní příjem jednotlivých diet v gramech (osa y), rozpočtený na týden a na jednu krysu. Na ose x týdny trvání pokusu. L_{15} (23,2 % bílk.) — značeno plně, L_{16} (42,9 % bílk.) — čárkovaně, L_{19} (6,7 % bílk.) — tečkovaně.

*) Statisticky zpracoval František Zítek, Matematický ústav ČSAV, Praha.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

bylo stejné jako v prvním sdělení, na které odkazujeme pro získání přesných údajů a detailního složení pokusných diet. Nízkobílkovinná dieta obsahovala 6,7 %, dieta se středním podílem bílkovin 23,2 % a vysokobílkovinná dieta 42,9 % bílkovin. Denně jsme sledovali po celé trvání pokusu spotřebu jednotlivých diet (obr. 1) Konsum diet stejně jako v pokuse s krátkodobým vystavením dietám ukazuje, že nebylo v podstatě rozdílu ve spotřebě jednotlivých diet, že tedy kalorická hodnota přijaté potravy byla v průměru ve všech skupinách stejná. Pokles spotřeby u všech skupin mezi 8. a 17. týdnem připadal na letní období s vysokými teplotami. Rozdílné vlastnosti jednotlivých skupin jsou tedy výsledkem rozličného složení diet. Krysy jsme vážili pravidelně jednou týdně a sestrojili růstové křivky (obr. 2).



Obr. 2. Růstové křivky jednotlivých skupin. Na ose y jsou průměrné váhy v gramech. Na ose x týdny od počátku podávání diet. Statistické zhodnocení rozdílu průměrných vah jednotlivých skupin vyhodnoceno Studentovým t-testem. Všechny tři rozdíly se ukázaly jako vysoce významné ($P < 1\ ^0/_{00}$). L_{15} (23,2 % bílk.) — značeno plně, L_{16} (42,9 % bílk.) — čárkovaně, L_{19} (6,7 % bílk.) — tečkovaně.

Čtyři měsíce po začátku podávání pokusných diet jsme všem krysám z ocasní vény po odstřižení konečku ocasu odebrali krev na stanovení hladiny komplementu a na provedení kontrolních aglutinací. Všechny kontrolní aglutinace byly ve všech ředěních bez výjimky negativní. Na konci sedmého měsíce od počátku podávání pokusných diet jsme imunisovali polovinu pokusných krys intraperitoneálně 6 dávkami ve dvoudenních intervalech teplem inaktivované suspense *Salmonella paratyphi* B (5×10^6 mikrobů na jednu imunisační dávku). Po skončené imunisaci jsme odebírali 5., 7., 10., 14., 21., 28., 35., 42. a 49. den z ocasní veny krev na stanovení aglutinujících protilátek. Současně jsme stanovili hladinu celkových bílkovin v krevním seru pokusných krys. Zjistili jsme, že krysy krmené nízkobílkovinnou dietou mají průměrně 5,85 % celkových bílkovin sera, tedy množství odpovídající literárním i našim zkušenostem. Krysy s vysokobílkovinnou dietou měly 6,91 % a krysy se středním podílem bílkovin v dietě 7,04 % celkových bílkovin sera, tedy obě skupiny prakticky stejné. Hladina celkových bílkovin u vysokobílkovinných diet se po přechodném poklesnutí, prokázaném v našem prvním sdělení, opět vyrovnala na normální hodnoty.

Konečně po skončení odběrů jsme provedli infekční pokusy ve 12 skupinách se stanovením bakteriemie a přežíváním. Titrace komplementu, aglutinující protilátky a infekční pokus se stanovením bakteriemie a přežívání jsme zjišťovali obdobně jako v pokusech prvního sdělení.

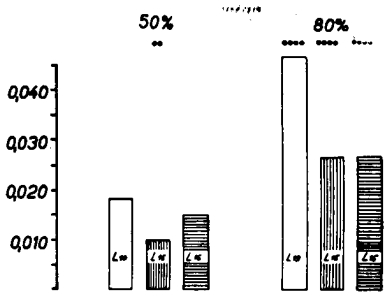
Spontánní hynutí krys v průběhu dietního pokusu bylo významné ve skupině krys s nízkobílkovinnou dietou. Druhý a čtvrtý měsíc po začátku podávání diet uhynulo v této skupině po jedné, pátý a šestý měsíc po dvou, sedmý a osmý měsíc po třech krysách, takže celkem uhynulo z 30 krys ve skupině 12. Příčiny uhynutí byly spontánní infekce postihující převážně dýchací trakt. Naproti tomu ze skupin s vysokým a středním podílem bílkovin v dietě neuhynula za celou dobu osmi měsíců trvání pokusu ani jediná krysa.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Výsledky

Hladina komplementu po čtyřech měsících podávání diet (obr. 3) ukazuje velmi nízké hodnoty komplementu u nízkobílkovinné skupiny. Rozdíly množství komplementu jak u 50 %, tak u 80 % hemolysy proti skupinám s vysokým a středním podílem bílkovin, jsou statisticky velmi významné. Komplement u skupin s vysokým a středním podílem je téměř stejný; rozdíl u 50 % hemolysy je na hranici významnosti, u 80 % hemolysy není významný.

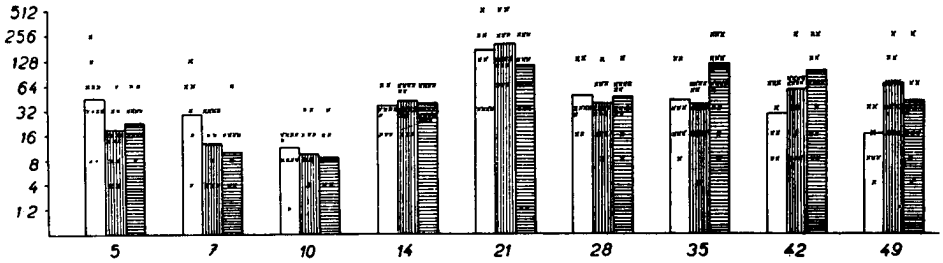


Obr. 3. Množství komplementu v průměrech ze 30 krys, udané v absolutních množstvích sera, potřebných pro 50% a 80% hemolysu. Kroužky udávají počet případů, ve kterých ani nejvyšší množství sera, použitého v pokusech (0,045 ml), nevyvolalo uvedené procento hemolysy. Do výpočtu pro sestavení grafu bylo u těchto případů bráno množství nejblíže vyšší (0,05 ml). Statisticky zhodnoceno Cochran-Coxovou aproximací Studentova t-testu pro rozdíl dvou průměrů.

50% hemolysa: L_{19} (prázdný sloupec) 0,018; L_{15} (svisle čárk.) 0,010; L_{16} (vodorovně čárk.) 0,014

80% hemolysa: L_{19} (prázdný sloupec) 0,046; L_{15} (svisle čárk.) 0,026; L_{16} (vodorovně čárk.) 0,026

Hladina aglutinujících protilátek všech tří skupin (obr. 4) ukazuje, že mezi jednotlivými skupinami není nápadného rozdílu. Statistické zhodnocení nevýznamnost těchto rozdílů potvrdilo. Pouze v pátém dnu dosáhl rozdíl mezi skupinami s nízkým a středním podílem a v 21. a 35. dnu mezi skupinami se středním a vysokým podílem hranice významnosti ($P < 5$ %).



Obr. 4. Tvorba aglutinujících protilátek. Na ose y jsou průměry titrů aglutinujících protilátek jednotlivých skupin. Na ose x dny odběrů krve po skončené imunisaci. Křížky označují individuální titry jednotlivých krys. Statisticky zhodnoceno Wilcoxonovým β-testem.

Čísla udávají přesné numerické hodnoty jednotlivých průměrů.

L_{19} (prázdný sloupec):	46,1	28,0	10,4	33,6	156,4	49,7	45,3	30,2	15,4
L_{15} (svisle čárk):	17,6	12,0	8,8	41,6	192,0	40,0	38,6	58,1	61,8
L_{16} (vodorovně čárk.):	21,8	9,6	8,0	40,5	100,5	48,5	104,0	79,4	46,4

Rozdíly v počtu bakterií v krevním oběhu v 1., 3. a 6. hodině po infekci (tab. 1) ukazují stejně jako v pokusu s krátkodobým vlivem diet, že přestup bakterií z peritoneální dutiny do krevního oběhu a mizení bakterií z krve se řádově liší (je statisticky vysoce významné) u krys imunisovaných a neimunisovaných. Rozdíly mezi jednotlivými dietními skupinami krys nejsou významné.

Výsledky infekčního pokusu (tab. 2) ukázaly, že není nápadného rozdílu mezi jednotlivými dietními skupinami krys. To potvrdil i statistický rozbor, který vyhodnotil rozdíly jako nevýznamné. Nápadný rozdíl, statisticky velmi významný, je mezi krysami imunisovanými a neimunisovanými.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Tab. 1. Stav bakteriemie 1, 3 a 6 hodin po infekci u imunisovaných a neimunisovaných krys jednotlivých dietních skupin. Číselné hodnoty udávají průměrný počet mikrobů v 1 ml krve. Statisticky zhodnoceno Wilcoxonovým β-testem.

	% bílkovin	1 hodina	3 hodiny	6 hodin
imunisované	L_{15} — (23,2)	12.546	734	167
	L_{16} — (42,9)	2.971	1.220	1.500
	L_{19} — (6,7)	2.009	1.025	487
neimunisované	L_{15} — (23,2)	157.995	117.970	92.490
	L_{16} — (42,9)	201.880	138.835	100.633
	L_{19} — (6,7)	132.208	132.575	21.250

Tab. 2. Přežívání infekce. Jednotlivé řádky znamenají skupiny postupně brané do pokusu. Statisticky zhodnoceno Wilcoxonovým β-testem.

Označení skupiny	Počet krys	Dávka	Uhynutí v hod. po infekci										Počet přeživších
			3	6	9	12	15	18	21	24	48	72	
L_{15} (23,2 % bílk.) imun.	2	1 DL 100											2
	2	3 DL 100						1					1
	3	4 DL 100											3
	2	10 DL 100									2		0
	3	10 DL 100						1	1		1		0
	3	8 DL 100					1	1		1			0
L_{16} (42,9 % bílk.) imun.	2	1 DL 100											2
	2	3 DL 100											2
	2	4 DL 100											2
	3	10 DL 100							1				2
	3	10 DL 100				1	1				1		0
	2	8 DL 100						1		1			0
L_{19} (6,7 % bílk.) imun.	2	1 DL 100										1	1
	2	2 DL 100											2
	2	3 DL 100											2
	2	10 DL 100				1		1					0
L_{15} (23,2 % bílk.) neimun.	2	1 DL 100				1			1				0
	2	$^1/_2$ DL 100											2
	3	$^3/_4$ DL 100											3
	2	1 DL 100									1		1
	3	1 DL 100				1	1						1
	3	1 DL 100				2	1						0
L_{16} (42,9 % bílk.) neimun.	2	1 DL 100			1				1				0
	2	$^1/_2$ DL 100					1						1
	2	$^3/_4$ DL 100											2
	3	1 DL 100						2			1		0
	3	1 DL 100							1				2
	3	1 DL 100						1		1			1
L_{19} (6,7 % bílk.) neimun.	2	1 DL 100				1		1					0
	2	$^1/_2$ DL 100											2
	2	$^3/_4$ DL 100											2
	2	1 DL 100				1							1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Diskuse

V dlouhodobém podávání diet se jednotlivé skupiny vzájemně rozlišily. Zvířata skupin s vysokým a středním podílem bílkovin měla normální vzhled, zatím co krysy skupiny nízkobílkovinné se význačně odlišovaly. Jejich srst byla řídká s místy úplně holými. Spontánní infekce je rychle zabíjela. Protože uhynulo více než $^1/_3$ zvířat pouze v nízkobílkovinné skupině krys, domníváme se, že zde došlo k přirozenému výběru nejodolnějších jedinců, kteří se zřejmě dietním podmínkám lépe přizpůsobili. Tito jedinci, kteří přestáli dlouhodobý konsum nízkobílkovinné diety, se pak vyrovnali druhým skupinám v tvorbě specifických protilátek, ačkoli hladina celkových bílkovin krevního sera byla značně snížena a v infekčním pokuse se rovněž vyrovnali druhým skupinám. Schopnost tvořit při nižší hladině celkových bílkovin sera normální množství specifických protilátek je dalším dokladem jevu, o němž jsme mluvili již v prvním sdělení, že totiž hladina specifických protilátek není přímo závislá na množství serových bílkovin. Normální tvorbu specifických protilátek našich krys dlouhodobě krmených nízkobílkovinnou dietou je možno srovnat s údaji Bielerovými a sp. (1947) a Balchovými (1950).

Skupina vysokobílkovinných krys se zřejmě podávané dietě přizpůsobila velmi rychle, jak je patrno již z hladiny komplementu a všech ostatních reakcí. Není možno, kromě váhového rozdílu, nalézt odlišení od krys se středním podílem bílkovin. Pravděpodobně se krysy, krmené vysokobílkovinnou dietou, po kratším období pozměněných reakcí rychle na podávanou dietu adaptují a dochází k vyrovnání jejich reaktivity. Změnu reaktivity po krátkodobém podávání diety můžeme vysvětlit tím, že se organismus vyrovnává s nárazem nezvyklého složení potravy. Obdobné výsledky nalezl ve svých pokusech Hrůza (1955), který sledoval rozdíly v štěpitelnosti jaterních bílkovin po krátkodobém a dlouhodobém podávání diet s nízkým a vysokým obsahem bílkovin a stejně Lát (1955) s vyšší činností nervové soustavy u krys chovaných dlouhou dobu při vysokobílkovinné dietě.

Zároveň vyzdvihujeme, že při dlouhodobém podávání pokusných diet se nám nepodařilo zvětšit rozdílnost imunologické reaktivity mezi jednotlivými dietními skupinami, ale právě naopak že rozdílnosti dosažené krátkodobým podáváním diet byly smazány.

Souhrn

1. Po dlouhodobém podávání (osm měsíců) nízkobílkovinné, bílkovinami vyvážené a vysokobílkovinné diety krysám jsme nenalezli významné rozdíly v tvorbě specifických protilátek po imunisaci a v přirozené a získané odolnosti vůči *Salmonella paratyphi* B. Rozdíly získané krátkodobým podáváním diet se dlouhodobým podáváním nepodařilo prohloubit, ale naopak došlo k jejich smazání.

2. Po čtyřech měsících od začátku podávání diet jsme stanovili hladinu komplementu. Skupina krys s nízkobílkovinnou dietou měla významně menší množství komplementu proti skupinám krys krmených dietou s vysokým a středním podílem bílkovin.

3. U skupiny nízkobílkovinných krys nastalo během pokusu významné hynutí na spontánní infekce, takže docházelo k přirozenému výběru odolnějších jedinců.

4. Poukázali jsme na možnost adaptace na dlouhodobé podávání diety.

Autor děkuje D. Johanovské a B. Hofmanové za technickou spolupráci.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Literatura

Balch, H. H.: *Relation of nutrional deficiency in man to antibody production.* J. Immunol. 64 : 397, 1950.

Bieler, M. M., Echer, E. E., Spies, T. D.: *Serum protein in hypoproteinemia due to nutrional deficiency.* J. Lab. Clin. Med. 32 : 130, 1947.

Hrůza, Z.: *O zásobách bílkovin v organismu.* Disertační práce, Praha 1955.

Lát, J.: Osobní sdělení. 1955.

Trnka, Z.: *Vliv nedostatku a nadbytku bílkovin v potravě na imunitní odpověď. I. Krátkodobé vystavení dietám.* Čs. mikrobiologie 1 : 49, 1956.

Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Steffee, C. H., Cannon, P. R.: *The relationship of the protein reserve to antibody production. II. The influence of protein repletion upon the production of antibody in hypoproteinemic adult white rats.* J. Immunol. 52 : 267, 1946.

Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Steffee, C. H.: *Influence of aminoacid feeding upon antibody production in protein depleted rats.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 62 : 199, 1946.

Влияние недостатка или избытка в пище белков на иммунную реакцию. II.

Длительная диэта

З. Трнка

Резюме

При долговременном (8-месячном) низкобелковом, высокобелковом и уравновешенном в смысле содержания белков рационе у крыс не наблюдалось сколько-нибудь значительной разницы в образовании специфических антител после иммунизации и в естественной или приобретенной устойчивости по отношению к Salmonella paratyphi B. Разницу, полученную при кратковременной диэте, не только не удавалось увеличить в результате длительного рациона, а напротив, эта разница стиралась. Уровень комплемента определялся через 4 месяца после начала опыта с диэтой. У группы крыс, получавших бедную белками пищу, количество комплемента было значительно меньше в сравнении с крысами, получавшими богатый белком или нормальный корм. В течение опыта в группе крыс с низкобелковой пищей наблюдался значительный падеж в результате спонтанных инфекций, так что осуществлялся естественный отбор наиболее устойчивых особей.

Обсуждается возможность приспособления к длительной односторонней диэте.

The Influence of Protein Deficiency and Excess in Diet on Immunity Response. II.

Long-term Administration of Diets

Z. Trnka

Summary

After the long-term administration (eight months) of a low protein, medium and high protein diet in rats, no significiant differences were found in the formation of specific antibodies following immunisation and in natural and acquired resistance to Salmonella paratyphi B. The differences obtained by the short-term administration of the diets were not accentuated on long-term administration; on the contrary, these differences were effaced. Four months after commencing the diets the level of complement was determined. The group of rats with protein deficiency had a significantly smaller amount of complement as compared with the groups of rats fed on a high protein and medium protein diet. In the group of rats fed on a low protein diet, a significant number of deaths occurred from spontaneous infection in the course of the experiment, resulting in natural selection of the more resistant individuals. The possibility of adaptation to long-term administration of the diet is discussed.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 3

Stanovení počtu zárodků sporulujících aktinomycet v půdě a jejich isolace

ZDENĚK ŘEHÁČEK

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 15. 11. 1955

Aktinomycety představují jednu z velkých skupin půdních mikroorganismů, jejíž rozšíření v půdě nemůžeme dodnes přesně kvantitativně stanovit, protože stávající metodiky jsou zatíženy značnými chybami. Výsledky bývají většinou skresleny průvodními mikroby, zejména plísněmi, které počítání aktinomycet velmi ztěžují nebo dokonce znemožňují.

Někteří autoři, na př. Horváth, Szolnoki a Felföldi (1953) se snažili řešit tento problém použitím selektivních půd; jejich výsledky však nebyly uspokojivé. Kručkova (podle Rybalkiny a Kononěnkové 1953) zalévala sklíčka se vzorkem půdních mikroorganismů různými živnými půdami, aby zjistila jednotlivé fysiologické skupiny mikrobů; spojila vlastně metodu přímého pozorování s metodou selektivních půd. Yoshioka (1952) inhiboval růst půdních bakterií provázejících aktinomycety ve zcentrifugované suspensi půdního vzorku furacinem přidaným do Czapkovy agarové živné půdy v koncentraci 1 : 50 000; furacin však ovlivňoval také aktinomycety a nepůsobil téměř na plísně. Waksman a Starkey (1947) isolovali kmeny aktinomycety *Streptomyces griseus* produkující streptomycin na agarových plotnách s 25 γ streptomycinu/ml. Použití živné půdy s antibiotikem splňuje do jisté míry svůj účel při isolaci omezeného počtu druhů aktinomycet, pro zachycení pokud možno nejširšího počtu zástupců aktinomycet však účinku antibiotika přidaného do půdy využít nemůžeme. Také práce badatelů Wintra (1949) a Knorra (podle Rehma 1953), kteří částečnou sterilisací půdních vzorků (2 hod. při 98 °C) silně zredukovali počet mikrobů provázejících aktinomycety, nelze bez námitek aplikovat na kvantitativní stanovení počtu aktinomycet v půdě.

V této práci jsme se snažili vypracovat takový postup pro sledování počtu a pro isolaci zárodků aktinomycet, který by odstraněním nebo alespoň zredukováním nedostatků dosavadních metod přispěl k vyřešení této základní otázky. Práce Yoshiokova (1952) nás přivedla na myšlenku sledovat zastoupení aktinomycet v půdě na podkladě využití rozdílných rozměrů jednotlivých druhů mikroorganismů při centrifugaci.

Teorie o isolaci mikroorganismů centrifugací

Abychom si mohli odhadnout, do jaké míry budeme moci dělit suspensi mikroorganismů na kyvetové centrifuze, vypočtli jsme si teoretickou dráhu, kterou urazí spóry nebo buňky mikroorganismů v odstředivém poli po 20 min. centrifugování při různém počtu otáček za minutu. Při tomto propočtu jsme vycházeli ze Stokesova zákona v modifikaci Svedberga a Nicholse (podle Herouta et al. 1954):

$$t = \frac{1}{K} \cdot \frac{\eta \,.\, ln\, X_2/X_1}{\omega^2 \,.\, r^2(d_p - d_m)}$$

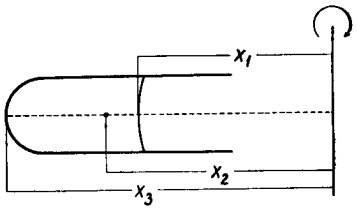
při čemž t = čas ve vteřinách, za který se posune částice hustoty d_p z bodu o poloměru rotace X_1 do bodu o poloměru rotace X_2 (viz obr. 1) kapalinou o hustotě d_m. Dále r = poloměr částice v cm, η = viskosita kapaliny v poisech, K = konstanta pro daný tvar částice, ω = úhlová rychlost v radiánech/sec.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Výsledky výpočtů uvádíme v tab. 1. Tabulku 2 s rozměry některých v úvahu přicházejících mikrobů jsme sestavili z údajů Krasiľnikových (1949) i Thomových a Raperových (1945, 1949).

Ze získaných propočtů je patrno, že při 20min. centrifugaci je pro studovaný úkol nejvhodnější použít 3000 ot/min, při nichž lze předpokládat, že částečky odpovídající rozměry spórám plísní nebo buňkám na př. mikroba *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, t. j. mikroorganismů, které počítání kolonií aktinomycet na plotně nejvíce ohrožují, budou sedimentovat na dno kyvety. Částečky odpovídající rozměry spórám aktinomycet budou při udané centrifugaci ovlivněny nepatrně a zůstanou ve svrchní tekutině.



Obr. 1. Sedimentace částice v kyvetové odstředivce. X_1 = horní poloměr rotace, X_2 = dráha uběhnutá částicí v odstředivém poli, X_3 = spodní poloměr rotace.

Tabulka 1. Sedimentace částic v kyvetové odstředivce po 20 min. centrifugaci

Ot/min	Částice (r)				
	0,6 μ	0,9 μ	1,5 μ	1,8 μ	2,4 μ
	Dráha v cm uběhnutá v odstředivém poli (X_2)				
1500	9,14	9,30	9,90	10,42	11,61
2000	9,26	9,60	10,81	11,67	14,29
2500	9,41	9,94	11,99	13,58	18,49
3000	9,60	10,42	13,65	16,56	25,53
3500	9,82	10,99	15,63	19,96	37,07
4000	10,10	12,36	18,24	25,47	57,15

Hodnoty jsou udány pro centrifugu, v níž horní poloměr rotace X_1 = 9,0 cm a spodní poloměr rotace X_3 = 16,0 cm.

Tabulka 2. Rozměry některých mikoorganismů

Mikroorganismus	Buňky	Spóry
Actinomyces coelicolor		0,7
A. longisporus		1,1—1,5 × 0,7
A. oidiosporus		1,0—1,8 × 0,5—1,0
A. viridis	0,5—0,8 řidčeji	1,0—1,5 × 0,7—0,8
A. fradiae	1,0—1,2	1,0—1,5 × 0,7
A. griseus		0,8—0,9
A. praecox		1,0—0,7
A. glaucus		1,0—0,8
A. globisporus		0,8
Azotobacter	2,7 × 2,5—10,0	
B. cereus	1,0—1,5 i 3,0—5,0	1,2—1,5 × 0,9
B. megatherium	1,2—1,5—10,0	1,5 × 0,7—1,0
B. mesentericus	3,0—10,0 × 0,5	0,9 × 0,5
B. mycoides	0,8—1,2—2,0—10,0	1,0—1,5 × 0,8—1,0
B. radicicola	1,5—2,5 × 0,6	
B. subtilis	3,0—5,0 × 0,6	
E. coli	1,0—3,0 × 0,5	
Nitrosomonas	1,1—1,8 × 0,9	
Pseudomonas	1,0—1,5 × 0,5	
	Konidiofory	Konidie
Aspergillus niger	200,0—400,0 × 7,0—10,0	2,5—4,0
Penicillium expansum	150,0—750,0 × 3,0—3,5	3,0—3,5

Hodnoty jsou udány v μ.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Pro umožnění kontroly námi získaných výsledků na kterékoliv centrifuze a pro srovnání s případnými údaji v literatuře uvádíme nejvhodnější odstředivou sílu v hodnotě násobku gravitační síly vypočtené ze vzorce $R = 1{,}117 \,.\, r \,.\, N^2 \,.\, 10^{-5}$, kde N vyjadřuje počet ot/min a r = poloměr centrifugace. Optimální centrifugace na kyvetové centrifuze o horním poloměru rotace $X_1 = 9{,}0$ cm a o spodním poloměru rotace $X_3 = 16{,}0$ cm jsme dosáhli při relativní odstředivé síle 904 G na hladině a 1609 G u dna kyvety.

Materiál a metody

Příprava mikrobní suspense pro centrifugaci. Jeden ml vodné suspense každého studovaného mikroba *(B. subtilis, E. coli, A. coelicolor, Pen. notatum)* získané se šikmé agarové půdy jsme přenesli do 100 ml sterilní destilované vody. Vzniklou suspensi jsme zředili destilovanou vodou v poměru 1 : 10^6 a po důkladném protřepání jsme ji rozdělili na pět dílů po 50 ml. Každý díl jsme pak centrifugovali 20 min. při 2000, 2500, 3000, 3500 nebo 4000 ot/min. Necentrifugované vzorky jsme sledovali jako kontroly.

Příprava půdního vzorku pro centrifugaci. Čerstvý vzorek zahradní půdy (pH = 7,0, sušina = = 82,64 %) jsme rozdělili na dva díly. První díl vzorků rozvážených po 1 g jsme ředili destilovanou vodou pouze důkladným protřepáním, druhý díl — také 5 vzorků po 1 g — jsme před ředěním rozetřeli ve třence pistilem s malým množstvím vody. Konečné ředění všech vzorků jsme upravili na 1 : 10^4 a 50 ml každého vzorku jsme centrifugovali 20 min. při 3000 ot/min. Kontroly jsme necentrifugovali.

Očkování agarové živné půdy zcetrifugovaným vzorkem. Ze svrchní tekutiny zcentrifugovaného vzorku jsme přenesli 1 ml suspense do rozehřáté agarové půdy (40 °C) podle Gauzeho (Petrušova 1953): saccharosa 20,0 g, KNO_3 1,0 g, K_2HPO_4 3,0 g, $CaCO_3$ 0,5 g, agar 15,0 g, H_2O ad 1000,0 ml, pH = 7,0. Po důkladném promíchání jsme zaočkovanou živnou půdu vylili na Petriho misky o průměru 12 cm a po utuhnutí ji inkubovali při 27 °C.

Stanovení počtu zárodků sporulujících aktinomycet v půdním vzorku a jejich isolace. Z půdního vzorku jsme odvážili 1 g půdy, rozetřeli jej s malým množstvím sterilní destilované vody, doplnili na celkový objem 100 ml, důkladně protřepali a upravili na zředění 10^{-4} nebo 10^{-6}. Z takto připravené suspense jsme 20 min. centrifugovali ve 100 ml kyvetách 50 ml suspense při 3000 ot/min. Z horní vrstvy svrchní tekutiny zcentrifugovaného vzorku jsme odpipetovali 4 ml suspense a naočkovali jimi 4 rozehřáté agarové živné půdy podle Gauzeho (po 40 ml); po promíchání jsme je vylili na Petriho misky o průměru 12 cm. Vyrostlé kolonie aktinomycet jsme odečítali nebo odočkovávali po 10denní kultivaci při 27 °C. Každý půdní vzorek jsme analysovali současně dvakrát, takže konečné výsledky jsme vyjadřovali údaji představujícími průměry hodnot z osmi ploten. Takto získané údaje jsme přepočítali na množství zárodků aktinomycet v 1 g sušiny analysovaného vzorku, a to tak, že jsme součin stonásobku počtu kolonií a ředění půdní suspense dělili procenty sušiny půdního vzorku. Na příklad vyrostlo-li z půdního vzorku zředěného 10^{-4} a o sušině = 82% na plotně průměrně 50 kolonií, bylo v 1 g sušiny studovaného vzorku $\frac{50 \,.\, 100 \,.\, 10\,000}{82}$ zárodků aktinomycet schopných vývoje na použité živné půdě.

Výsledky

Centrifugace uměle připravené mikrobní suspense

Abychom si ověřili teoretické výsledky centrifugační metody experimentálně, sledovali jsme vliv 20 min. centrifugace při různém počtu ot./min. na suspensi mikrobů *B. subtilis*, *E. coli*, *A. coelicolor* a *Pen. notatum* ve vodě.

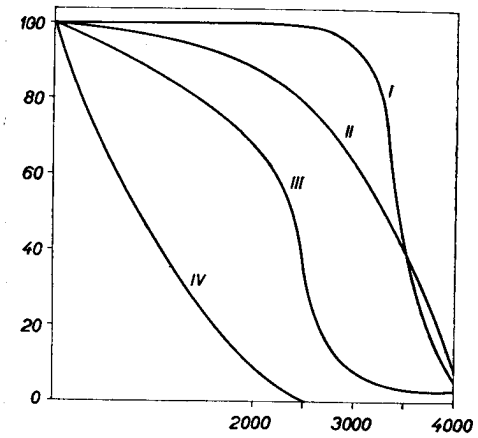
Tabulka 3. Vliv 20min. centrifugace na suspensi spór a buněk mikrobů

Ot./min	Množství kolonií							
	B. subtilis		*E. coli*		*Pen. notatum*		*A. coelicolor*	
	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%
0	49	100	30	100	13	100	55	100
2000	42	85	20	67	1	8	55	100
2500	40	82	10	33	0	0	54	98
3000	34	62	2	7	0	0	53	96
3500	17	37	1	3	0	0	22	40
4000	4	8	1	3	0	0	3	5

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Z dosažených výsledků vyjádřených průměrem pěti měření, uvedených v tab. 3 a znázorněných v obr. 2 je patrno, že spóry aktinomycety byly 20min. centrifugací při optimálních 3000 ot./min. ovlivněny nepatrně. Počet kolonií aktinomycety vyrostlých ze zcentrifugovaného vzorku byl pouze o 4 % nižší než počet kolonií vyrostlých z původní nezcentrifugované suspense spór aktinomycety. *Pen. notatum* jsme na miskách zaočkovaných zcentrifugovanou suspensí (20 min. při 3000 ot./min.) nezaznamenali. K odstranění této plísně se svrchní tekutiny se ukázala dostatečnou 20min. centrifugace již při 2500 ot./min. Také počet buněk mikroba *E. coli* se nám podařilo odstřeďováním ovlivnit; ze suspense zcentrifugované 20 min. při 3000 ot./min. vyrostlo o 93 % kolonií méně než v kontrole. Méně výrazné snížení počtu kolonií mikroba *B. subtilis* vyrostlých na plotně ze suspense zcentrifugované 20 min. při 3000 ot./min. lze vysvětlit tím, že *B. subtilis* byl patrně v suspensi převážně ve formě spór, které vzhledem ke svým rozměrům (viz tab. 2) jen potvrdily náš teoretický předpoklad a ze svrchní tekutiny centrifugovaného vzorku nevymizely.



Obr. 2. Vliv 20 min. centrifugace na suspensi spór a buněk mikrobů. Osa x : ot./min., osa y : množství kolonií v %. I = *A. coelicolor*, II = *B. subtilis*, III = *E. coli*, IV = *Pen. notatum*.

Vliv nejvhodnější centrifugace (20 min. při 3000 ot./min.) na vodnou suspensi spór pěti makroskopicky odlišných kmenů aktinomycet jsme sledovali ve zvláštním pokusu. Rozdíly mezi počtem kolonií vyrostlých ze zcentrifugovaného vzorku a počtem kolonií kontroly nevybočil z teoretických předpokladů — vliv použité centrifugace se projevil zcela nepatrně.

Centrifugace suspense půdního vzorku

Další ověřovací pokusy centrifugační metody jsme prováděli na půdním vzorku suspendovaném ve vodě a centrifugovaném 20 min. při 3000 ot./min. Ze vzorků zaočkovaných zcentrifugovanou suspensí připravenou rozetřením vyrostlo po inkubaci při 27 °C průměrně 65 kolonií na plotně, ze vzorků s nerozetřenou suspensí pouze 25 kolonií. Uvedené rozdíly naznačují, že pouhé protřepávání půdního vzorku s vodou pro kvantitativní stanovení zárodků aktinomycet nestačí; značný počet spór aktinomycet klesá při centrifugaci s půdou ke dnu. Pro zpřesnění výsledků je tedy výhodné rozetřít půdní vzorek před ředěním s malým množstvím sterilní destilované vody. Případné rozlámání mycelových vláken aktinomycet v živé fragmenty, k němuž by mohlo dojít při roztírání půdního vzorku, nepovažujeme pro konečné výsledky za nebezpečné, protože podle prací Skinnerových (1950) jsou aktinomycety v půdě převážně ve formě spór.

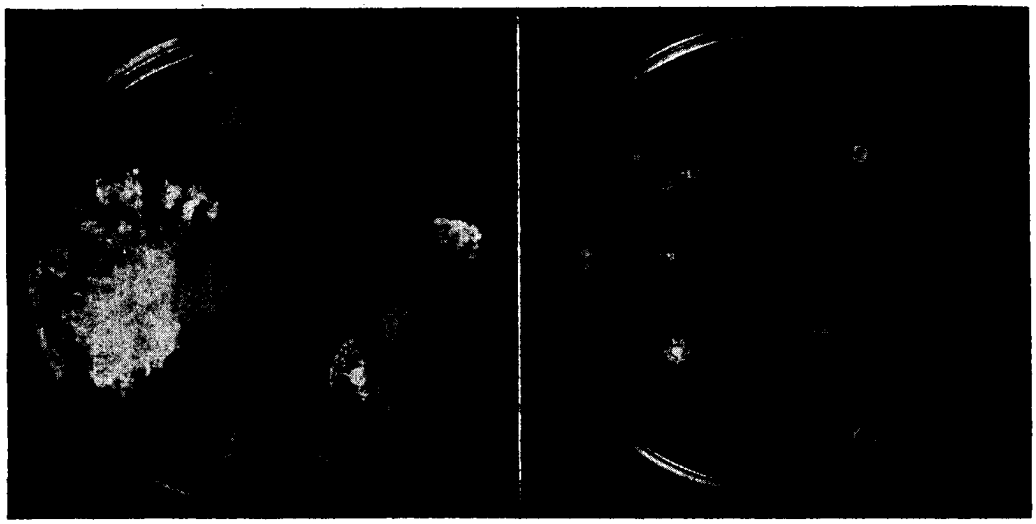
Diskuse

Uvedená modifikace plotnové metody přispívá ke zpřesnění kvantitativního stanovení zárodků sporulujících aktinomycet v půdě. Využívá rozdílného pohybu jednotlivých druhů mikroorganismů v odstředivém poli a umožňuje tak odstranit z analysovaného vzorku některé nežádoucí průvodní mikroby, na př. plísně, kterými

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

zejména v jarních měsících plotny přerůstají (obr. 3 a 4). Rozlišení určitých mikrobů na miskách s bohatou mikroflorou při použití původní plotnové metody často selhává. Metoda identifikace má své hranice a při malém zředění 10^{-3} nebo 10^{-4}, kterého se pro stanovení počtu aktinomycet běžně užívá, je velmi nepřesná — organismy přítomné v půdním vzorku v malém množství nezachytí. Při centrifugační metodě tato nesnáz odpadá, neboť půdní vzorek můžeme ředit jen podle počtu aktinomycet v něm obsažených bez ohledu na ostatní mikrofloru. Odstranění průvodních mikroorganismů centrifugací vylučuje také jejich antagonistický vliv, který by se mohl na plotnách uplatnit a konečné výsledky skreslit.



Obr. 3. Agarová plotna zaočkovaná 1 ml *nezcentrifugované* suspense půdního vzorku zředěného 1 : 10 000. Průvodní mikroflora znemožňuje odečítání kolonií aktinomycet.

Obr. 4. Agarová plotna zaočkovaná 1 ml *zcentrifugované* suspense půdního vzorku zředěného 1 : 10 000. (Centrifugováno 20 min. při 3000 ot./min.) Většina průvodní mikroflory aktinomycet byla centrifugací odstraněna, kolonie aktinomycet lze snadno odečíst a isolovat.

Centrifugační metoda se však osvědčila také jako metoda isolační. Její předností je to, že ve většině případů získáváme na plotnách kolonie čistých kultur aktinomycet (obr. 4), které pak můžeme přímo z prvního kultivačního media podrobit dalšímu studiu nebo přeočkovat na konservy. Kromě časové úspory — odpadá totiž zdlouhavé čištění kmenů — získáváme i možnost sledovat isolované aktinomycety poměrně čerstvé, ovlivněné kultivací v laboratorních podmínkách vzhledem k současným isolačním metodikám měrou daleko menší.

Souhrn

V práci je uveden podrobný postup pro stanovení počtu zárodků sporulujících aktinomycet v půdě a pro jejich isolaci. Popsaná metoda využívá rozdílného pohybu jednotlivých druhů mikroorganismů v odstředivém poli, odstraňuje z analysovaného půdního vzorku průvodní mikroorganismy aktinomycet, vylučuje jejich vliv na kultivačních plotnách a tak podstatně přispívá ke zpřesnění dosavadních metodik. Předností uvedené metody jako metody isolační je to, že umožňuje získat během

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

10 dnů kolonie čistých kultur aktinomycet, které lze přímo z prvního kultivačního media podrobit dalšímu studiu nebo přeočkovat na konservy. Odpadá tudíž zdlouhavé čištění kmenů, takže isolované aktinomycety jsou ovlivněny kultivací v laboratorních podmínkách vzhledem k současným isolačním metodám minimálně.

Literatura

Horváth, J., Szolnoki, J., Felföldi, L.: *Experiments to establish relationship between antibiotic properties of species of Streptomyces and their soils.* Acta Biol. Hung. 4 : 453, 1953.

Herout, V., Keil, B., Protiva, M., Hudlický, M., Ernest, J.: *Laboratorní technika organické chemie.* Praha 1954.

Krasiľnikov, N. A.: *Opredelitel' bakterij i aktinomicetov.* Moskva 1949.

Petrušova, N. J.: *Issledovanije antogonističeskich svojstv aktinomicetov po otnošeniju k fitopatogennym grîbam.* Mikrobiologija 22 : 577, 1953.

Rybalkina, A. V., Kononěnko, J. V.: *Neposredstvennoje nabljudenije mikroflory v počve modificirovannym metodom Cholodnovo.* Mikrobiologija 22 : 439, 1953.

Rehm, H. J.: *Untersuchungen über die Bildung von Antibiotika durch Streptomycesarten und ihre Wirkung.* Wiss. Zschr. Univ. Greifswald 2 : 59, 1952/53. Matem.-naturwiss. Reihe 1.

Skinner, F. A.: *Preparation of standardised actinomycete colonies.* Nature 166 : 314, 1950.

Thom, Ch., Raper, K. B.: *A manual of the Aspergilli.* Baltimore 1945.

Thom, Ch., Raper, K. B.: *A manual of the Penicillia.* Baltimore 1949.

Winter, G. A.: *Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Ophiobolus graminis und anderen Organismen mit Hilfe der Afwuchsplatte-Methode.* Arch. Mikrobiol. 14 : 240, 1949.

Waksman, S. A., Starkey, R. L.: *The soil and the microbe.* New York 1947.

Yoshioka, H.: J. Antibiotics (Japan) 5 : 559, 1952.

Определение количества спорообразующих актиномицетов в почве и их изоляция

З. Ржегачек

Резюме

В статье приводится подробное описание приемов квантитативного определения количества спорообразующих актиномицетов в почве и их выделения из почвы. Предлагаемый метод, используя 20-минутное центрифугирование взвеси образца почвы при относительной центробежной силе 904 G на поверхности и 1609 G на дне кюветки, устраняет таким образом сопутствующие микроорганизмы актиномицетов, содержащиеся в образце почвы, исключает их появление в культурах на пластинках и значительно уточняет результаты применявшихся до сих пор методик. Преимуществом изоляции по этому методу является то, что так возможно в течение 10 дней получить чистые культуры актиномицетов, которые могут быть непосредственно из первоначальной культивационной среды пересеяны на консервы или же подвергнуты дальнейшему изучению. Таким образом, отпадает длительный процесс очистки штаммов и, при современных методах изоляции, влияние выращивания в лабораторных условиях сказывается на выделяемых актиномицетах минимально.

Determination of the Number of Spores of Sporulating Actinomyces in the Soil and Their Isolation

Z. Řeháček

Summary

The communication gives a detailed description of a new method for the quantitative determination of the number of sporulating Actinomyces in the soil and for their isolation. The method described involves 20 minutes' centrifugation of a suspension of a sample of the soil at a relative centrifugal strength of 904 G at the surface and 1.609 G at the bottom and thus removes the micro-organisms accompanying the Actinomyces contained in the sample of the soil, excludes their influence on the culturing plates and substantially contributes to making the present methods more accurate. As a method of isolation it has the advantage that it makes it possible to obtain within 10 days colonies of pure cultures of Actinomyces, which can be re-inoculated direct from the first culture medium on to conserving media, or may be used for further study. In this way the tedious purification of strains is done away with, so that influence on the isolated Actinomyces by culturing under laboratory conditions is minimal as compared with present isolation methods.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 3

Hodnocení růstových křivek *Escherichia coli*

KAREL MARHA a JAN MÜLLER

Ústav hygieny práce a chorob z povolání, Praha

Došlo 30. 7. 1955

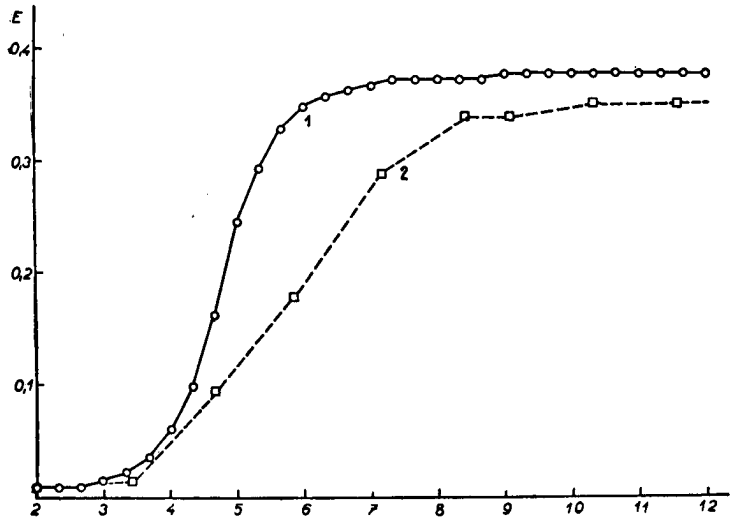
Růstové křivky mikroorganismů mají esovitý charakter. U bakterií se ještě objevuje tak zvaná fáze latence, to je čas, který potřebuje kultura od svého nasazení k začátku patrného růstu. Při hodnocení růstových křivek by bylo nejvýhodnější znát vyhovující rovnici růstu a posuzovat číselné hodnoty konstant této rovnice. Při tom předpokládáme znalost biologického významu těchto konstant.

Průběh růstových křivek byl již mnohokráte matematicky řešen (souhrn literatury u Backmanna 1943, Brodyho 1945 a Hinshelwooda 1944); výsledkem je řada empirických a poloempirických rovnic.

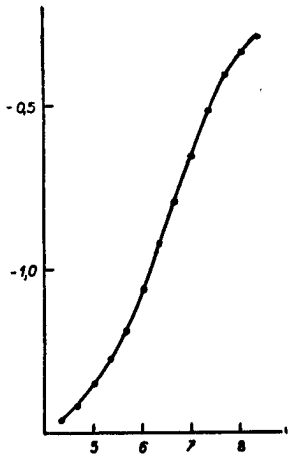
U bakterií se obvykle mluví o té části křivky, kdy rychlost růstu stoupá až k maximu, jako o fázi logaritmické, to je pro tuto fázi by měl logaritmus počtu organismů v kultuře lineárně stoupat s časem. Vyjádříme-li tuto závislost rychlostí růstu, pak by platilo:

$$\frac{dx}{dt} = kx \qquad 1$$

což značí, že rychlost růstu $\frac{dx}{dt}$ je v každém okamžiku přímo úměrná počtu organismů x, k je konstanta úměrnosti.



Obr. 1. Růstové křivky bakterií *Escherichia coli*. 1 - křivka vynesená ze záznamu automatického registračního fotometru. 2 - křivka získaná z jednotlivých seriových měření na kolorimetru Colemann Junior (10 kyvet bylo současně vyňato z termostatu, odneseno ke kolorimetru a po proměření vráceno do termostatu). Osa x - čas v hodinách, osa y - extinkce.



Obr. 2. „Logaritmická fáze" růstové křivky *E. coli* v semilogaritmických souřadnicích. Měřeno na automatickém fotokolorimetru. Osa x - čas v hodinách, osa y - log extinkce.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Tak i Kleinzeller, Málek a Vrba (1954) výslovně uvádějí, že „nanášíme-li logaritmus růstu měřený jakoukoli formou (počtem buněk, turbiditou atd.) na osu y, čas na osu x, obdržíme v logaritmické fázi přímkovou závislost " a ukazují to právě na růstu *Escherichia coli*.

Tato závislost také zhruba platila v našich měřeních, pokud jsme k proměřování zákalu kultury používali běžné kolorimetrické metody. Po zavedení automatické registrační nefelometrie (Marha a Jenšovský 1955), která je podstatně přesnější a vykazuje menší rozptyl hodnot (měření se provádí automaticky v termostatu, takže růst probíhá za konstantních podmínek — obr. 1) se ukázalo, že tato závislost je jen hrubou aproximací (obr. 2).

Pokusili jsme se proto odvodit růstovou křivku na základě kinetických úvah a aplikovali jsme ji na růst *E. coli*. Růstová rychlost kultury je funkcí počtu živých organismů; tento vztah můžeme vyjádřiti rovnicí:

$$\frac{dx}{dt} = f(x) \qquad 2$$

Rychlost dělení bude tím větší, čím kratší bude generační doba. Generační dobou rozumíme čas, za který vznikne z daného počtu buněk dvojnásobný počet. Shrneme-li dosud řečené, docházíme k závěru, že rychlost růstu je přímo úměrná počtu organismů x a nepřímo úměrná generační době Δt. Matematicky vyjádřeno:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{kx}{\Delta t} \qquad 3$$

Kdybychom předpokládali konstantní generační dobu, dostali bychom exponenciální křivku. To pro část logaritmickou předpokládá většina autorů. Jelikož tento předpoklad neodpovídá našim experimentálním výsledkům (obr. 2), hledali jsme další závislosti.

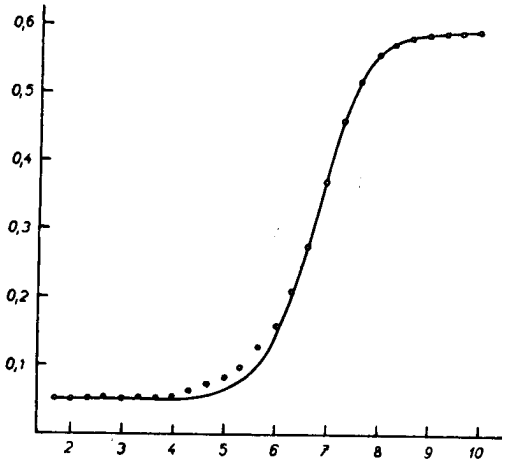
Předpokládáme-li konstantní generační dobu, musela by se růstová rychlost při stále stoupajícím počtu organismů zvětšovat. To ovšem odporuje našim zkušenostem. Víme naopak, že růstová rychlost stoupá do určitého maxima a pak klesá k nule a další množení se zastavuje. Musíme proto předpokládat, že generační doba není konstantní a že stoupá z určité počáteční hodnoty do nekonečna, kde růst je zastaven. Generační doba je proto nepřímo závislá na tak zvané růstové kapacitě, což je rozdíl maximálně dosažitelného a skutečného počtu organismů v daném čase a prostředí, vyjádřeném ve zlomku maximálního počtu organismů. Označíme-li růstem maximálně dosažitelný počet organismů v daném mediu jednotkou, můžeme výše uvedené vyjádřit takto:

$$\Delta t = \frac{k_0}{1-x} \qquad 4$$

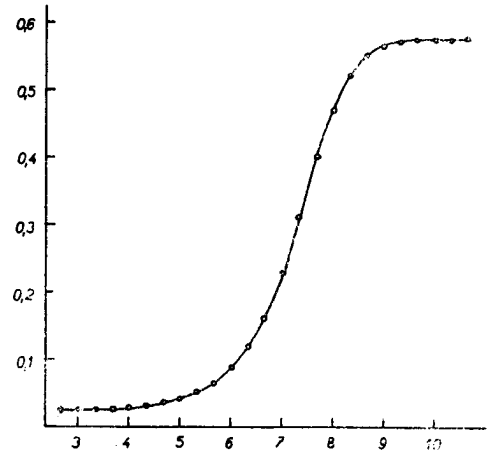
při čemž k_0 je generační doba v čase nula, x v tomto případě je počet organismů, vyjádřený v procentech celkového maximálně dosažitelného počtu organismů.

Dosadíme-li rovnici 4 do rovnice 3, dostaneme:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{kx(1-x)}{k_0} \qquad 5$$



Obr. 3. Průběh růstové křivky podle rovnice 6 v porovnání s experimentálními body. Kultivační medium obsahovalo králičí serum. Osa x - čas v hodinách, osa y - extinkce.



Obr. 4. Průběh růstové křivky podle rovnice 9 v porovnání s experimentálními body. Kultivační medium obsahovalo králičí serum. Osa x - čas v hodinách, osa y - extinkce.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Řešením této diferenciální rovnice dojdeme k rovnici symetrické esovité křivky:

$$t = t_i - \frac{k_0}{k} \ln \frac{1-x}{x} \qquad 6$$

při čemž t_i je čas, ve kterém křivka probíhá inflexním bodem.

Testovali jsme tuto rovnici na svém materiálu a zjistili jsme, ža tato funkce poměrně dobře vyhovovala pro kultury pěstované v syntetickém mediu, nevyhovovala však pro kultury, k nimž bylo přidáno serum (obr. 3). To bylo způsobeno tím, že růstové křivky bakterií v syntetickém mediu byly velmi přibližně symetrické, zatím co v mediu s přidaným serem byly asymetrické. Příčinou asymetrie bylo, že v počáteční fázi růstu byla generační doba delší, než by odpovídalo rovnici 6 a tím rychlost růstu v této fázi menší. Předpokládali jsme proto v seru přítomnost brzdicího faktoru, který prodlužoval generační dobu o hodnotu b. Proto tedy bude:

$$\Delta t = \frac{k_0}{1-x} + b \qquad 7$$

Dosazením tohoto výrazu do rovnice 3 a úpravou dostaneme:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{kx(1-x)}{k_0 + b - bx} \qquad 8$$

Řešením této diferenciální rovnice dostaneme:

$$(k_0 + b) \ln \frac{x}{1-x} + b \ln (1-x) = kt + c \qquad 9$$

Tuto rovnici jsme opět testovali na svém materiálu a dostali jsme dobrou shodu s experimentálními body (obr. 4).

Jsme si ovšem vědomi toho, že poměry nejsou asi tak jednoduché, jak jsme zde vylíčili. To jsme si ujasnili při propočítávání konstant rovnice 9 na základě svého experimentálního materiálu. Je velmi pravděpodobné, že v průběhu vzniku velkého počtu generací mikroorganismů v kultuře se vyvíjí adaptace na brzdicí faktor, takže jeho účinná hodnota klesá. Pro zrakovou adaptaci bylo zjištěno (Kravkov 1950), že není-li systém příliš vzdálen od rovnovážného stavu, probíhá adaptace podle exponenciály. Účinnost brzdicího faktoru adaptací klesá:

$$f(b) = \frac{b}{e^{\lambda t}} \qquad 10$$

při čemž λ je adaptační konstanta.

Vezmeme-li tedy v úvahu adaptaci, mění se generační doba Δt z rovnice 7 za použití výrazu 10. podle vztahu:

$$\Delta t = \frac{k_0}{1-x} + \frac{b}{e^{\lambda t}} = \frac{k_0 e^{\lambda t} + b - bx}{(1-x)\, e^{\lambda t}} \qquad 11$$

dosazením do rovnice 3. dostáváme:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{kx\,(1-x)\, e^{\lambda t}}{k_0 e^{\lambda t} + b - bx} \qquad 12$$

Toto je diferenciální rovnice rychlosti růstu *E. coli* s uvážením adaptace.

Podle Kravkova probíhá adaptace, je-li systém příliš vzdálen od rovnovážného stavu, podle esovité křivky. Uvážením tohoto způsobu adaptace by se stal celý problém růstu po stránce matematické ještě obtížnější.

Výsledky naší práce poukazují na některé nedořešené otázky a ukazují, že problém růstových křivek mikroorganismů není jednoznačně vyřešen, jak se mnozí autoři domnívají.

Souhrn

Na základě experimentálního materiálu, získaného měřením růstu *E. coli* automatickým kolorimetrem, jsme zjistili, že pro tak zvanou logaritmickou fázi neplatí dosud uznávaný předpoklad linearity této části růstové křivky v semilogaritmických souřadnicích. Na základě kinetických úvah jsme učinili pokus o analytické vyjádření růstové křivky. Rovnice mají konstanty s určitým definovaným biologickým významem. Řešili jsme vliv tak zvaného brzdicího faktoru na tvar růstové křivky a odvodili vyhovující rovnici pro tento typ asymetrických křivek. Na základě číselných hodnot konstant této rovnice jsme zjistili, že v průběhu růstu dochází k adaptaci na brzdicí faktor. Odvodili jsme diferenciální rovnici růstu za tohoto předpokladu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Literatura

Backmann, G.: *Wachstum und organische Zeit.* Leipzig 1943.
Brody, S.: *Biogenetic and growth.* New York 1945.
Hinshelwood, C. N.: *Physical-chemical aspects of bacterial growth.* Am. Rep. Progr. Chem. 41 : 15, 1944.
Kleinzeller, A., Málek, J., Vrba, R.: *Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii.* Praha 1954.
Kravkov, S. V.: *Glaz i jevo rabota.* Moskva 1950.
Marha, K., Jenšovský, L.: *Automatický registrační fotometr.* Chem. listy 49 : 926, 1955.

Оценка кривых роста у Escherichia coli

К. Марга и Я. Мюллер

Резюме

На основе экспериментального материала, полученного путем измерений роста E. coli с помощью автоматического колориметра, было установлено, что для т. н. логарифмической фазы не действует признававшаяся до сих пор гипотеза линеарности этой части кривой роста в семилогарифимческих координатах. На основании кинетических рассуждений был сделан опыт аналитического выражения кривой роста. Уравнения имеют постоянные величины определенного биологического значения. Исследовалось влияние т. н. тормозящего фактора на форму кривой роста и было выведено уравнение, отвечающее этому типу асимметрических кривых. На основе числовых показателей постоянных величин этого уравнения было установлено, что в процессе роста происходит адаптация к тормозящему фактору. Было выведено дифференциальное уравнение роста с учетом этого момента.

An Evaluation of the Growth Curves of Escherichia coli

K. Marha, J. Müller

Summary

On the basis of experimental material obtained by measuring the growth of E. coli with an automatic colorimeter, it was found that the hitherto recognised assumption of linearity of the logarithmic phase of the growth curve in semi-logarithmic coordinates is not valid. On the basis of kinetic considerations an attempt was made to find the analytic expression of the growth curve. The equations have constants with a certain defined biological significance. The influence of the so-called „braking" factor on the shape of the growth curve was estimated and the appropriate equation for this type of asymmetric curve was derived. On the basis of the numerical values of the constants of this equation it was found that adaptation to the braking factor occurs in the course of growth. On the basis of this finding the differential equation of growth was derived.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 3

Metodika mikrointervalové imunisace

JAROSLAV ŠTERZL a OTAKAR KRÁLÍK

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

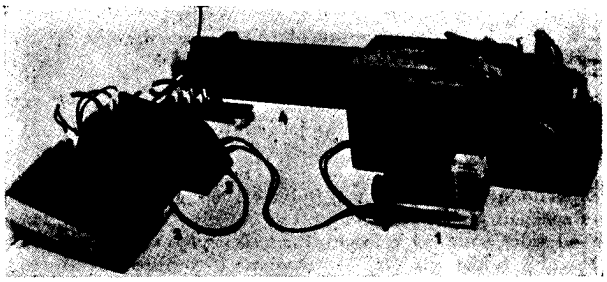
Došlo 28. 9. 1955

Často si klademe otázku, zda běžné jednorázové vpravení antigenu je nejvhodnější způsob pro optimální tvorbu protilátek. Některé práce ukazují na významnost intervalů, v kterých je stejné množství antigenu vpraveno do organismu. Prvé práce Friedbergrovy a spolupracovníků (1927a, b, c) sledovaly vliv jednorázového rychlého vpravení antigenu ve srovnání s jeho dlouhodobým kontinuálním injikováním. Autoři dostali tímto způsobem výrazné snížení tvorby protilátek (4—16krát), zvýšení anafylaktické sensibilisace a při injikování živých mikrobů tímto způsobem i zvýšení infekčnosti stejné dávky. Zvláště v poslední době pod vlivem práce Plecitého a Alymova (1951), kteří popsali při mikrointervalovém vpravení rychlý vznik imunity a zprávy Zdrodovského (1953a) o významnosti mikrointervalů pro zvýšení tvorby protilátek se obrátila pozornost pracovníků tímto směrem.

Přistoupili jsme k řešení vlivu časových intervalů při vpravení stejného množství antigenu na tvorbu protilátek. Prvním předpokladem bylo, abychom měli možnost při injikování antigenu přesně volit intervaly i množství, které chceme injikovat, případně i řídit dobu, po kterou bychom plynule vpravovali antigen. K tomu jsme zkonstruovali přístroj pro řiditelný vstřik antigenu.

Popis zařízení

Aparatura sestávala ze 3 základních dílů: 1. posuvného mechanismu s dorazem a vstřikovacím zařízením, 2. časovacího zařízení a 3. zpožďovacího obvodu. Mechanismus přístroje byl řešen tak, aby umožňoval kontinuální vstřik měnitelný od několika minut do 60 hodin, nebo vstřik rozdělený na intervaly s měnitelným odstupem v tomtéž rozmezí (obr. 1a, b). Vlastní posun byl zhotoven z delšího dílu křížového stolku k mikroskopu, na kterém byl upevněn doraz pro páku pístu injekční stříkačky a elektromagnet, jehož jho bylo prodlouženo do tvaru palce. Vřeteno bylo spojeno dvojitým šnekovým převodem



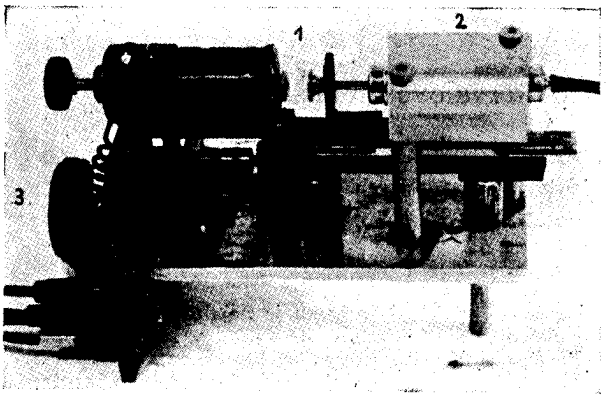
Obr. 1a. Celkové uspořádání přístroje pro vstřik antigenu:
1. Posuvný mechanismus se vstřikovacím zařízením.
2. Časovací zařízení s nastaveným desetiminutovým odstupem impulsů.
3. Zpožďovací obvod.
4. Svorkovnice a posuvný odpor pro nastavení rychlosti motoru.

a ozubeným soukolím s kolektorovým motorem na 24 V/5 W. Motorek byl napájen z děliče, který dovoloval změnu obrátek ve velikém rozsahu, pro rychlejší posun bylo možno vyřadit jeden ze šnekových převodů. Vlastní stříkačka byla pevně uchycena na stolku, který nesl všechny uvedené díly. Pro kontinuální vstřik bylo možno nastavit jho elektromagnetu tak, že píst se pohyboval zároveň s posuvem. Při přerušovaném vstřiku ujížděl zvolenou rychlostí regulovanou obrátkami motoru doraz, na který byla vždy v nastaveném intervalu domáčknuta páka pístu stříkačky palcem elektromagnetu. Kombinací rychlosti posunu dorazu s odstupem intervalu vstřiku bylo tedy možno dosáhnout řady možností v dávkování.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

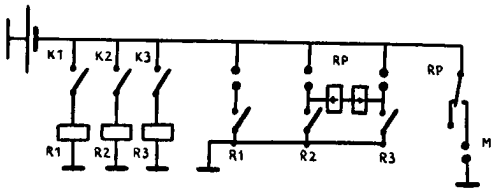
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Impulsy pro rozdělený vstřik dávalo impulsní zařízení (obr. 2), sestavené z hodinového stroje s několika servorelé. Do místa kotvy nepokoje byl namontován pružný kontakt, který dával impulsy asi 0,1 sec. s odstupem 1 sec. (K_1). Minutové impulsy byly dávány z vypinatelných kontaktů pod minutovou ručičkou (K_2), takže bylo možno v jedné hodině uskutečnit 60 impulsů s minutovým odstupem

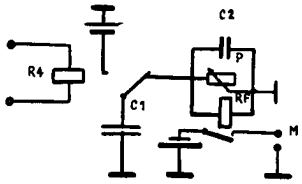


Obr. 1b. Detail vstřikovacího zařízení.
1. Doraz a elektromagnet posunovaný motorem.
2. Injekční stříkačka.
3. Převody.

nebo méně impulsů s odstupem delším. Impuls minutového kontaktu byl asi 3 sec. Při delším nastaveném odstupu se doraz posuvného mechanismu dosti vzdálil od páky pístu stříkačky, takže k vyprázdnění takto odměřeného dílu antigenu bylo zapotřebí delšího impulsu. Byl tedy do okruhu časovacího zařízení a posuvného mechanismu zařazen zpožďovací obvod, kterým se dal 3 sec. impuls prodloužit plynule až na 30 sec.



Obr. 2. Schema časovacího impulsního zařízení:
K_1, K_2, K_3 = vteřinové, minutové a hodinové doteky,
R_1, R_2, R_3 = vteřinové, minutové a hodinové servorelé,
RP = polarisované relé,
M = svorky pro připojení motoru.



Obr. 3. Schema zpožďovacího obvodu:
R_4 = nabíjecí elektromagnetické relé,
C_1, C_2 = kondensátory MP 16 uF,
P = potenciometr 50 KΩ lin.
RF = deprézské relé typ F (3.500 Ω),
M = svorky pro připojení motoru.

Zpožďovací obvod (obr. 3) byl sestaven z nabíjecího relé (R_4), které po přivedení impulsu z časovacího zařízení připojilo kondensátor *C 1* na zdroj napětí, takže *C 1* byl nabíjen. Po přerušení impulsu relé odpadlo a nabitý kondensátor byl připojen k obvodu *R—C*, který tvořil potenciometr *P* a kapacita *C 1* a *C 2*, takže relé *RF* — připojené k tomuto obvodu bylo přitaženo a uzavřelo okruh svorek *M*, na které byl připojen buď elektromagnet při impulsovém vstřiku nebo motor posuvného zařízení při vstřiku kontinuálním. Relé *F* uzavíralo okruh až do vybití *C 1* a *C 2* do odporu *R* a *RF*. Doba zpoždění odpadu byla nastavitelná změnou časové konstanty poměru C_2 a *P*. Hodinové impulsy byly dávány zvláštním kontaktem *K 3*, taktéž pod minutovou ručičkou. Do všech okruhů byly vřazeny servorelé (R_1, R_2, R_3), aby nebyly větším spínaným proudem namáhány přímo kontakty. V okruhu R_2 R_3 bylo zařazeno ještě polarisované relé, *(RP)*, které umožnilo libovolně dlouhé trvání vstřiku s přestávkou jedné hodiny. V tomto případě byl posuvný mechanismus nastaven na kontinuální vstřik zajištěním páky pístu v dorazu; vstřik nastal sepnutím okruhu motoru *(M)* tím způsobem, že první impuls jej uvedl do chodu a druhý zastavil. Celý přístroj byl doplněn propojovacími kabely a připojovací svorkovnicí. Napájen byl z ústřední baterie 24 V.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Použití

Injikovali jsme intravenosně vždy 1 ml antigenu (teplem inaktivovaných mikrobů *Salmonella paratyphi* B v 1 ml 5 . 10^7 mikrobů). V prvém pokuse jsme opakovali postup Friedbergův: vstřikovali jsme stejné množství antigenu a) jednorázově rychle, b) pomalým plynulým způsobem v průběhu 2 hodin, c) v minutových intervalech rozložených do 2 hodin vždy skupině po 3 králících. U každého zvířete jsme odebrali 17 vzorků krve v průběhu 4 měsíců. V žádném období tvorby protilátek jsme nenalezli výrazné rozdíly v intensitě titru protilátek.

Rovněž revakcinace u těchto skupin různě imunisovaných králíků neukázala rozdíl. Neprokázali jsme rozdíly v tvorbě protilátek ani u skupiny zvířat, kde jsme minutové intervaly zvýšili postupně na 5 –10 minut a celkovou dobu vpravení antigenu snížili na 30 minut.

Bezvýslednost těchto prvých pokusů nebylo možno zevšeobecnit; položili jsme si otázku, zda by se neprojevila sumace antigenu podávaného v mikrointervalech při vpravení minimálních dávek antigenu. Snížili jsme proto původní imunisační dávku 50krát; v 1 ml imunisační suspense bylo 10^6 mikrobů. V pokuse jsme srovnávali účinek normální rychlé intravenosní imunisace s imunisací rozředěným antigenem, který byl vpraven v intervalech 10 minut vždy po 0,1 ml antigenu, celková doba imunisace 100 minut. Ani v takto upraveném pokuse se neukázal významný rozdíl mezi skupinou imunisovanou intrevalovým schematem a mezi kontrolami.

V později publikované práci Zdrodovského (1953b) jsme viděli, že tak zvaná mikrointervalová imunisace v jeho pokusech je každodenní vpravení 5 . 10^8 mikrobů. Domníváme se, že tyto pokusy představují především sumační efekt množství vpravovaného antigenu, že nelze tento postup hodnotit pouze jako zvyšování reaktivnosti organismu opakovaným podrážděním. Jsme i toho názoru, že nelze prostě ztotožnit sumaci dávek antigenu s depotní imunisací, kde vpravené množství antigenu zůstává po celou dobu imunisačního pochodu stejné.

Souhrnně z těchto pokusů uzavíráme, že při imunisaci bylo pro intensitu protilátkové odpovědi nejvýznamnější vždy stejné množství vpravovaného antigenu a že se neprojevil zvláštní sumační účinek, bylo-li toto množství rozděleno do řady dávek vpravených v mikrointervalových (1—10minutových) časových odstupech.

Souhrn

Zkonstruovali jsme přístroj k řiditelnému automatickému injikování antigenu, který umožňuje měnit množství vpravovaného antigenu, celkovou dobu imunisace a intervaly mezi jednotlivými dávkami.

Imunisace provedené touto aparaturou, rozdělením určitého množství antigenu do řady dávek v 1 až 10 min. intervalech, neukázaly rozdíly v intensitě a dynamice tvorby protilátek ve srovnání s jednorázovým vpravením stejného množství antigenu.

Literatura

Alymov, A. J., Plecityj, D. F., Averjanova, L. L.: *O skorosti perestrojki immunologičeskoj reaktivnosti.* ŽMEI (1): 4, 1955.

Friedberger, E., Seidengerg, S.: *Weitere Versuche zur Theorie der Antikörperbildung.* Zschr. Immunitätsforsch. 52 : 202, 1927a.

Friedberger, E., Seidengerg, S.: *Einfluss der Dauer der Antigenzufuhr bei einmaliger Präparierung auf die Anaphylaxie des Meerschweinchens.* Zschr. Immunitätsforsch. 52 : 214, 1927b.

Friedberger, E., Ikeda, T.: *Über das Verhalten pathogener Bakterien bei langsamer Injektion und über den Heilwert des Serums bei protrahierter Zufuhr.* Zschr. Immunitätsforsch. 52 : 221, 1927c.

Plecityj, D.: *Nekotoryje voprosy teoriji immuniteta i privičnoj profilaktiky infekciji.* Sov. med. (11) : 5, 1951.

Zdrodovskij, P. F.: *Sovetskaja immunologija i jeje zadači.* ŽMEI, (5) : 6, 1953 a.

Zdrodovskij, P. F.: *Materialy k fiziologiji processov infekciji i immuniteta.* Vest. AMN SSSR, (3) : 3, 1953 b.

Zdrodovskij, P. F.: *Voprosy infekcionnoj patologiji i immunologiji.* Moskva 1954.

Методика иммунизации с микроинтервалами

Я. Штерцль и О. Кралик

Резюме

Мы сконструировали аппарат для управления автоматическими впрыскиваниями антигена, позволяющий менять количество вводимого антигена, общую продолжительность иммунизации и промежутки времени между впрыскиваниями отдельных доз.

Производившиеся с помощью этой аппаратуры опыты иммунизации путем разделения определенного количества антигена на ряд доз с 1—10-минутными интервалами не давали разницы ни в интенсивности, ни в динамике образования антител в сравнении с однократным введением такого же количества антигена.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

A Method of Micro-interval Immunisation

J. Šterzl and O. Králík

Summary

An apparatus was constructed for the regulated, automatic injection of an antigen. This permits changes to be made in the size of the dose, in the total period of immunisation and in the intervals between the individual doses.

Immunisation carried out with this apparatus, by dividing a certain amount of the antigen into a series of doses with 1—10-minute intervals, showed no differences in the intensity and dynamics of antibody formation as compared with a single injection of the same amount of the antigen.

Zprávy

Semináře o otázkách naší technické mikrobiologie

Komise technické mikrobiologie, vytvořená při biologické sekci ČSAV v roce 1953, si vytkla za svůj první cíl kritické přehlédnutí současného stavu všech odvětví technické mikrobiologie v ČSR. Uspořádala proto ve dnech 28.—30. VI. 1954 celostátní konferenci technické mikrobiologie, která ukázala jak kladné stránky tak nedostatky na tomto úseku; jedním z nejzávažnějších výsledků tohoto zasedání bylo rozhodnutí pořádat pravidelné semináře, věnované referátům z pracovišť o postupu a výsledcích výzkumných prací a diskusím o aktuálních otázkách technické mikrobiologie. Semináře byly zaměřeny tak, aby ukázaly jiným příbuzným úsekům získané zkušenosti a kriticky je zhodnotily. Neméně důležitým úkolem bylo odkrýt slabá místa některých méně vyspělých odvětví a ukázat cestu vpřed.

Nebylo náhodou, že právě první seminář (12. XII. 1954) byl věnován otázkám *selekce technických mikroorganismů*. Byly na něm předneseny různorodé referáty, z nichž zaujala zvláště zpráva doc. Leopolda o práci s provozním kmenem *Aspergillus niger* pro výrobu citronové kyseliny a metodické sdělení Dr Nečáska o výběru a udržování produktivnosti antibiotických kmenů penicilií a aktinomycet. Ohodnocováním kvasinek se zabýval pro lihovarské účely ing. Barta a pro pivovarské Dr Kocková. Podobného rázu byl i referát ing. Hrončeka o adaptaci octových bakterií pro submersní podmínky. Seminář ukázal, že skutečná selekce, založená na aktivním zásahu do dědičného základu produkčního kmene, a od které především je možno očekávat podstatná zvýšení produkce nebo i nové produkty látkové přeměny, je u nás dosud v začátcích. Bude tedy nutno nejdříve zdokonalit sbírku typových kultur, která by byla vybavena tak, aby mohla zajistit staré i nově získané produkční kmeny v plné a nezměněné aktivitě. Zároveň pak bude třeba zahájit systematické vyhledávání nových kmenů s využitím všech moderních zkušeností, ať už je to adaptace, vegetativní hybridisace nebo silně působící faktory s t. zv. mutagenním účinkem.

Druhý seminář (17. XII. 1954) nazvaný „*Enzymy mikrobů a jejich technické užití*" seznámil posluchače především s výsledky zkoušek zcukřování zápar plísňovými amylasami v zemědělských lihovarech (Dr Malcher, ing. Sova) i s biochemickými vlastnostmi těchto enzymových preparátů (Dr Beran, Dr Burger, Dr Dostál a Dr Tadra). V daleko menším rozsahu se pracuje s enzymy pektolytickými (Dr Závodský a Dr Strmiska). Významným zdrojem řady enzymů je i mycelium po fermentaci antibiotik, dosud však zcela nevyužité (Dr Čerkes). Sdělení Dr Hanče informovalo o mikrobiologických oxydacích steroidů. Ostatním enzymům je věnováno ještě méně pozornosti. Průmyslové enzymy mikroorganismů představují nový úsek technické mikrobiologie, v cizině již značně rozvinutý, u nás však narážející stále na nezájem při realisaci slibných laboratorních výsledků.

Velký zájem na sebe soustředil třetí seminář (18. II. 1955) o *použití antibiotik v zemědělství*. Osou semináře byly referáty o přípravě a použití krmiv obohacených antibiotiky (Dr Nečásek, dipl. biol. Matelová a ing. Müller). Naproti tomu zkoušky s užitím antibiotik proti fytopatogenním houbám (ing. Zemánek) se dosud konají v menším měřítku. Zájem o krmná antibiotika se projevil nejen rozsáhlou diskusí, ale i radostnou skutečností, že pracovníci ministerstva zemědělství na semináři přítomní ve velmi krátké době zajistili jejich výrobu ve velkém měřítku. Tento seminář tedy splnil své poslání velmi dobře.

Velmi naléhavou se ukázala otázka *desinfekce v potravinářském průmyslu*. Jí byl věnován čtvrtý seminář (29. IV. 1955), zahájený úvodem do problematiky tohoto významného oboru referátem prof. Babičky. Další sdělení pojednávala jednak o metodikách hodnocení desinfekčních látek (Dr Šimek), jednak o jejich použití (Dr Nečadová, ing. Bomar). Ukázalo se, že situace na tomto úseku není příliš utěšená a že bude třeba vynaložit velké úsilí, aby byly stanoveny vhodné způsoby desinfekce pro každý druh potravin a jejich obalů a aby bylo důsledně dbáno na jejich správné provádění.

Seminář nazvaný „*Mikrobiologická biosyntesa vitaminů skupiny B*" (27. V. 1955) pojednal z převážné části o riboflavinu. Přednesené referáty se týkaly biochemických problémů tvorby riboflavinu (Dr Kapralek), zkušeností s konservací a selekcí produkčního kmene (dipl. biol. Hošťálek a dipl. biol. Rytíř),

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

analytikou (Dr Fragner a dipl. chem. Černá-Heyrovská), výběrem fermentačních půd, vlivem fysiologických faktorů a konstrukčního materiálu na produkci B_2 u *Eremothecium ashbyi* (Dr Hanus a ing. Machalová). Jiným možným zdrojem riboflavinu je butanolacetonové kvašení (ing. Munk). Ukázalo se, že vypracování dokonalých laboratorních předpokladů pro převedení do výroby je podmínkou, k jejímuž splnění bude třeba spojit zúčastněná pracoviště, kriticky zrevidovat dosavadní výsledky a připravit správně zaměřený pracovní postup. I zde seminář vykonal dobře své poslání, neboť podněty, které vyvolal, byly brzo uvedeny ve skutek. Zbývající referáty tohoto semináře pojednávaly o analytice a laboratorní fermentaci vitaminu B_{12} (Dr Musílek, Dr Šimek a Dr Rábek). Byly vesměs dobré úrovně a lze doufat, že brzo vyústí v zavedení výroby.

Význačným rysem všech seminářů byla velká početní účast posluchačů, většinou pracovníků výzkumných ústavů a vysokých škol. Zájem o diskusi byl vždy velmi živý, bylo by si však přát, aby se vystřídalo více diskutujících a to i z řad pracovníků provozních a zástupců příslušných ministerstev. Komise technické mikrobiologie pak bude i nadále pečovat, aby program seminářů vycházel z aktuálních požadavků naší technické mikrobiologie a pomáhal jí tak ve vzestupném vývoji.

Doc. Dr Jiří Stárka

II. celostátní konference půdních mikrobiologů.

Ve dnech 27.—29. února 1956 probíhala v Domě vědeckých pracovníků J. E. Purkyně v Liblicích II. celostátní konference půdních mikrobiologů. Konferenci pořádala biologická sekce ČSAV ve spolupráci s Československou akademií zemědělských věd. Zúčastnilo se jí na 70 vědeckých pracovníků v půdní mikrobiologii a příbuzných oborech.

Na rozdíl od I. konference, která ukázala problematiku a rozpracovanost úkolů půdní mikrobiologie v Československé republice, soustředila se II. konference na tři nejdůležitější úkoly: 1. úlohu mikroorganismů ve výživě rostlin; 2. výrobu a použití bakterijních očkovacích látek v zemědělství; 3. mikrobní pochody v půdě při tvorbě a rozkladu humusu se zřetelem na humusová hnojiva. Konference měla ukázat na problematiku daných úkolů, naznačit další směr výzkumu, sjednotit a doporučit nejvhodnější metody a prozkoumat možnosti praktických využití dosud dosažených výsledků.

Konferenci zahájil předseda biologické sekce Československé akademie věd akademik I. Málek, za Československou akademii zemědělských věd prof. Dr A. Kroulík, dopisující člen ČSAZV. Prvý den se konference zabývala úlohou mikroorganismů ve výživě rostlin. Hlavní referát přednesl Dr K. Řídký. Vyzvedl úlohu mikroorganismů v koloběhu živin, uvedl návrh metodiky na sledování mikrobních pochodů v honech travopolního osevního postupu a hodnocení výsledků. Zdůraznil vhodnost mikrobiologických metod při sledování účelnosti takových agrotechnických zásahů, jako je doba a způsob zaorání travního plástu, doba a způsob zaorání mrvy pro okopaniny a podrývání půdy. Dokázal, že v těchto případech jde o podstatné ovlivnění mineralisačních procesů, což se ovšem promítá do sklizně plodin. Druhý doplňující referát přednesl Dr J. Lasík. Zabýval se v něm úlohou rhizosférních mikroorganismů ve výživě rostlin a vzájemnými vztahy mezi mikroorganismy a rostlinami. Referoval také o svých výsledcích při sledování kořenové exosmosy ječmene a hrachu. V diskusi potom vystoupili Dr V. Segeťová, která uvedla výsledky sledování mikrobních pochodů travopolních osevních postupů na dvou půdních typech. Ing. M. Vágner přednesl výsledky sledování rhizosféry jarní pšenice a Dr J. Žák se zabýval mikrobními pochody v rhizosféře stimulovaných rostlin. Dr J. Vraný referoval o svých výsledcích, které získal sledováním mikrobních pochodů při přeměně uhlíkatých látek a uvolňování živin v pískových kulturách, očkovaných podzolem nebo černozemí. Dr K. Vágnerová diskutovala o některých problémech výzkumu rhizosférní mikroflory, Dr B. Úlehlová o periodičnosti mikrobních pochodů při vývoji rostlin. Ing. M. Ambrožová sledovala vliv různých druhů závlah na mikrobní pochody, vhodnost některých fosforečných hnojiv pro komposty a účinnost uhelného prachu jako stabilisátorů dusíku v močůvce. Prom. biolog J. Drobník a Ing. Z. Ambrož referovali o svých výsledcích sledování aktivity půdních enzymů a zabývali se jejich vztahem k mikrobní činnosti a půdní úrodnosti. Prof. Dr V. Káš upozornil na komplexnost výzkumu úrodnosti půdy a zabýval se možnostmi stanovení stupně úrodnosti půdy. Dr Z. Řeháček navrhl originální metodu na stanovení a isolaci sporulujících aktinomycet v půdě. Dr A. Hovadík referoval o stanovení antagonistické schopnosti půd. O svých zkušenostech s mykorhizací lesních dřevin promluvil Ing. A. Sobotka.

Druhý den konference byl věnován výrobě a použití bakterijních očkovacích látek v zemědělství. Úvodní referát přednesla Dr E. Hlaváčková a koreferáty Doc. Dr J. Vintika a Dr J. Macura. Dr E. Hlaváčková vyzvedla význam hlízkových bakterií ve výživě motýlokvětých rostlin dusíkem, obšírně se zabývala problematikou kmenů rhizobií a kriticky upozornila na nedostatky ve výrobě a používání očkovacích látek pro motýlokvěté rostliny. V dalším referovala o problémech výroby a použití azotobaktera, silikátových a fosforových bakterií. V závěru zdůraznila nutnost vytvářet předpoklady pro rayonisaci bakterijních očkovacích látek. Doc. Dr Vintika se zabýval otázkou polyvalentních očkovacích látek a vzájemnými vztahy mezi použitými mikroorganismy a mezi mikroorganismy a rostlinami. V diskusním příspěvku promluvil o svých zkušenostech s novým způsobem barvení rhizobií, které

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

dovoluje diferencovat živé a mrtvé buňky a o svém nálezu t. zv. pěnových hlízek na kořenech motýlokvětých rostlin. Dr J. Macura ve svém koreferátu rozvedl otázku mechanismu účinku azotobaktera, seznámil posluchače s výsledky bakterisace cukrovky a ovsa, upozornil na otázku sledování a zlepšování podmínek rozvoje azotobaktera v rhizosféře rostlin a na možnosti zvyšování aktivity kmenů, používaných k bakterisaci. V diskusi potom Ing. J. Apltauer, Dr J. Kozová a PhMr V. Vančura upozornili na ovlivnění vlastností azotobaktera rostlinou a typem půdy a na rozdílný průběh dynamiky azotobaktera pod různými rostlinami. J. Mann navrhl vyzkoušení možnosti bakterisace semen v čistírnách šlechtěných osiv. O vlivu dusíkatého hnojení na azotobaktera referoval Dr Žák. Dr Hovadík přednesl své zkušenosti s bakterisací různých druhů zelenin. PhMr Vančura informoval o možnosti využití některých odpadových hmot při kultivaci azotobaktera. O submersní kultivaci azotobaktera a jeho biochemismu, zvláště se zřetelem k produkci metabolitů, vitaminů a růstových látek přednášeli IngC. J. Bárta a Ing. M. Rosa. Dr H. Vintiková seznámila posluchače se submersní kultivací hlízkových bakterií a s některými poznatky o silikátových bakteriích.

Třetí den konference byl věnován mikrobním pochodům v půdě při tvorbě a rozkladu humusu se zřetelem na použití humusových hnojiv. Hlavní referát přednesl Dr B. Novák. Seznámil posluchače se svými výsledky a zkušenostmi s kompostováním chlévské mrvy. Dokázal, že kompostovaná mrva zvyšuje více výnosy než mrva ukládaná do bloků za studena. Správným kompostováním mrvy se prohlubují a zesilují mikrobiologické procesy, jejichž výsledkem je intensivnější tvorba humusu. O mikrobiologických a jiných metodách výzkumu humusových hnojiv a humusu informovali Dr Kozová, prom. biol. Drobník, Ing. Soukup a J. Nováková. O kompostování vepřových extrementů a jeho sanitárním významu přednášel Ing. O. Leidgeb. Prom. biol. J. Kozderková referovala o svých výsledcích se sledováním mikrobní a enzymatické aktivity v luční půdě při dodání různých dusíkatých a uhlíkatých látek. Rozkladem uhlíkatých látek a tvorbou humusu se zabýval Ing. Ambrož. Cenné poznatky a zkušenosti s výzkumem humusu sdělili akademik S. Prát a prof. Dr A. Kroulík.

V závěru konference zhodnotil její průběh a výsledky prof. Dr V. Káš, dopisující člen ČSAZV. Zdůraznil, že výsledky výzkumu v některých odvětvích půdní mikrobiologie nám dovolují přenášet je do praxe. Jde především o přípravu a použití humusových hnojiv, bakterijní očkovací látky a pomoc mikrobiologů při správném stanovení doby a způsobu některých agrotechnických zásahů. Vyzvedl potřebu ještě užší spolupráce s půdoznalci, výživáři, agrotechniky a rostlinnými fysiology.

Z průběhu jednání konference vyplynula také nutnost prohlubování teoretických výzkumů, zaměřených do praxe. Hodnotí-li se konference s hlediska úkolů, které byly před ni postaveny, je možno říci, že splnila svůj úkol, i když některé důležité problémy současné půdní mikrobiologie nebyly při jednáních probírány. Úkoly, které z konference vyplynuly, budou obsaženy v resoluci.

Vlastimil Vančura

Vydává Biologický ústav Československé akademie věd v Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II. Adresa redakce: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Administrace: Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II, tel. 246241. Účet Státní banky československé č 438-214-0087, číslo směrovací 0152-1. Snížený poplatek povolen výměrem č. 313-400-Be-55. Dohledací poštovní úřad Praha 022. Tisknou a expedují: Pražské tiskárny, n. p., provozovna 04, Praha XIII, Sámova 12. Vyšlo dne 30. června 1956. - A-17523

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Směrnice pro přípravu publikací

Československá mikrobiologie uveřejňuje práce ze všech úseků mikrobiologie (obecné, lékařské, technické a zemědělské), pokud mají obecnější zaměření a význam. Otiskují se původní práce, krátká původní sdělení, přehledné referáty, diskusní články, recense knih, zprávy a redakční články. Předběžná sdělení budou uveřejňována jen výjimečně u prací zásadního významu.

Obecné pokyny

Všechny práce procházejí recensním řízením a o jejich uveřejnění rozhoduje redakční rada časopisu.

Autor nese plnou odpovědnost za původnost práce, za její věcnou a formální správnost; odpovídá rovněž za to, že publikace předkládané práce byla schválena jemu příslušnými nadřízenými orgány. Jako původní sdělení lze publikovat pouze takové výsledky, jejichž podstata nebyla dosud uveřejněna nebo podána autorem k uveřejnění jinde, ať doma či v zahraničí. Výjimku tvoří případná předběžná sdělení, na něž však musí být v práci odkázáno. Podstatný obsah práce podané v Čs. mikrobiologii nelze uveřejnit jinou formou bez svolení redakce.

Připomínky a zásahy recensentů a redaktorů mají za úkol především zlepšení kvality publikace. Sporné otázky mohou být řešeny diskusí zúčastněných stran, konečné rozhodnutí však přísluší redakční radě.

Rozsah publikace má být volen úměrně rozsahu a významu nových poznatků. Práce má být sepsána jasně, věcně a tak stručně, jak dovoluje srozumitelnost. Nemá obsahovat prvotní scestné hypotesy, nýbrž má být souhrnem konečných poznatků. O negativních výsledcích lze referovat (velmi stručně) jen tehdy, jsou-li ony samy nebo jejich důsledky teoreticky nebo prakticky zvlášť významné či zajímavé.

Název práce má být volen tak, aby výstižně vyjádřil tema a zaměření práce; práce publikované v řadě mají skupinový název (s číslem sdělení) a vlastní název. Vlastní text práce musí být logicky členěn na kapitoly, případně odstavce, opatřené nadpisy. Členění, stavba i forma se volí podle druhu, náplně a poslání práce, při čemž se ovšem přihlíží k některým obecným zásadám a zvyklostem časopisu. Práce má být členěna do těchto kapitol:

Úvod práce obsahuje údaje literatury a všeobecné úvahy, které jsou nutné k pochopení práce, jejího záměru a významu. Nejde-li o úvodní sdělení k rozsáhlejší řadě původních prací, nemá publikace obsahovat vyčerpávající přehledy literatury.

Materiál a metody. Tato část obsahuje stručné, avšak dostatečně přesné a úplné údaje o použitém materiálu (kultury, pokusná zvířata, preparáty, látky a pod.), metodách a zvolených pracovních postupech. Známé metody se nepopisují, stačí uvést název a příslušnou citaci.

Kapitola *Výsledky* uvádí zjištěná data, závislosti a pozorování v logickém a jasném utřídění experimentálního materiálu. Získané údaje se uvádějí v přehledně uspořádaných tabulkách anebo grafech. Tabulky a jejich grafické znázornění lze *současně* uveřejnit jen tehdy, je-li to bezpodmínečně nutné pro pochopení práce. Interpretace uvedených dat se zařazuje do části diskusní.

Diskuse podává kritický rozbor výsledků, jejich zhodnocení a interpretaci. Podstatné výsledky se shrnují v kapitole *Souhrn.* Ke každé práci přiloží autor souhrn pro cizojazyčné resumé a pro „Referativnyj žurnal" v takové formě, aby z něho byl zřejmý cíl práce a dosažené hlavní výsledky. Práci uzavírá seznam literatury [příklady citace viz Čs. mikrobiologie 1 (1), 1956].

Technické pokyny

Rukopisy prací v českém nebo slovenském jazyce je třeba zaslat s jednou kopií na adresu: Biologický ústav ČSAV, redakce Čs. mikrobiologie, Na cvičišti 2, Praha-Dejvice. V průvodním dopise uvede autor svoji přesnou adresu. Příjem rukopisu redakce potvrdí. Rukopisy jsou majetkem redakce a nemusí být autorovi vráceny. Redakce si vyhrazuje právo odmítat rukopisy, které neodpovídají požadavkům zde uvedeným. V každém případě bude mít nedodržení těchto pokynů za následek zdržení práce v redakci a její opožděné uveřejnění.

Úprava rukopisů. Rukopis musí být psán na stroji, s dvojitými mezerami (řádkování 2, nikoliv 1,5) a širokým okrajem (asi 3 cm) na dobrém bílém papíře formátu A4. Průsvitné nebo křídové papíry nejsou přípustné. Stránky rukopisu mají být číslovány. Formální úprava rukopisů se doporučuje podle úpravy prací (nejlépe tematicky podobných), uveřejněných v Čs. mikrobiologii.

Obrázky musí být výstižné a jasné, přehledné a přesně označené. Fotografie musí být dokonale ostré, kontrastní a na papíře s lesklým hladkým povrchem. Grafy je třeba kreslit černou tuší na bílém kresli-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2

cím, pausovacím nebo milimetrovém papíře (se slabě modrým rastrem). Velikost výkresu má být asi třikrát větší než požadovaná velikost v tisku. Znaky na obrázku musí být úměrně veliké a kreslené pomocí šablony ČSN (šablona 3—5 mm, šikmé písmo), při čemž má být respektován i druh písma. Redakce dává přednost uzavřeným grafům (s rámečkem) bez sítě, vyžaduje však přesný popis os souřadnic a jasné vyznačení jednotek (měřítka). Křivky je třeba označit číslicemi a slovní popis je nutno uvést v legendě, nikoliv v obrázku samém. Redakce si vyhrazuje právo grafy po technické stránce nevyhovující vrátit autorovi k překreslení, případně je dát překreslit na autorův náklad.

Tabulky musí být přehledné, jasně a logicky uspořádané, s minimálním počtem sloupců. V uzavřených tabulkách se zpravidla oddělují linkami pouze sloupce a záhlaví. Obrázky a tabulky musí být připojeny mimo text a jasně označeny na zadní straně pořadovým číslem, názvem práce a zařazením, nikoliv však legendou. Legenda (připojená za text práce) musí být volena tak, aby obrázek či tabulka byly srozumitelné bez studia textu. Každá legenda musí mít výstižný nadpis.

Názvosloví musí být ve shodě s běžnými zásadami autoritativní české, resp. slovenské odborné literatury. Zkratky jsou přípustné pouze tehdy, jsou li v obecné nebo chemické literatuře zcela běžně vžité.

Názvy sloučenin mají být nahrazovány chemickými vzorci pouze tehdy, jestliže jsou spojeny se symbolem (na př. s údajem koncetrace: 0,05M-H_2SO_4), po př. ve výčtech delší řady sloučenin, skupin či iontů. V práci případně zavedená zkrácená označení je třeba definovat při prvním výskytu.

Citace literatury. Zkratky časopisů podle Chemical Abstracts; zkratky ruských časopisů v české transliteraci.

Transkripce cizích slov. Cizí slova píšeme obvykle v původní formě. Pouze u slov zcela vžitých v hovorové řeči zjednodušujeme, na př.: metoda, teorie a pod.

Korektury. Za definitivní text práce je třeba považovat rukopis, korektury jsou tedy určeny pouze pro opravu tiskových chyb. Autorům se zasílá 1. korektura (sloupcová), případně také 2. korektura (stránková). Autor je povinen věnovat korekturám, zejména ověření všech vzorců a číselných údajů, co nejvyšší pozornost a péči. Ve výjimečných případech je přípustné doplnit text poznámkou pod čarou (doplněk při korektuře). Redakce není povinna respektovat zřetelně chybné korektury autora; ve sporných případech přísluší rozhodnutí redakční radě. Autorské korektury je bezpodmínečně nutno vracet během tří dnů, jinak nemůže být k autorovým korekturám přihlédnuto, případně bude uveřejnění práce odloženo.

Separáty. 50 otisků každé práce se zasílá autorům na jejich náklad. Ve zvláštních případech, dohodnutých nejpozději při vracení sloupcové korektury, může být na odůvodněnou písemnou žádost zhotoven větší počet separátů na náklad autora.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500003-2