Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
1

ČÍSLO
4

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, SRPEN 1956 - STR. 145—192

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

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

V. Vinter: Sporulace bacilů. III. Přechod vápníku do buněk a pokles proteolytické aktivity prostředí při sporulaci Bacillus megatherium 145

J. Dyr a J. Protiva: Produkty látkové výměny během růstu Clostridium acetobutylicum . . 151

M. Dostálek a M. Spurný: Kultivační charakteristiky desulfurikačních bakterií z naftových ložisek 158

J. Šterzl: Dlouhodobá imunisace. II. Změny peritoneálního exsudátu, reakce leukocytární a teplotové 165

M. Svoboda a J. Šalplachta: Poznámky k čištění odpadních vod mlékárenských pomocí Oospora lactis 176

Č. Kalina a M. Padevět: Nový způsob barvení mikrobů 184

Kritiky a recense 190

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

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 4

Sporulace bacilů. III.

Přechod vápníku do buněk a pokles proteolytické aktivity prostředí při sporulaci *Bacillus megatherium*

VLADIMÍR VINTER

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 6. 1. 1956

Při procesu sporulace *Bacillus megatherium* dochází za určitých podmínek k prudkému snížení proteolytické aktivity prostředí. V minulé práci (Vinter 1956) jsme popsali základní charakteristiku tohoto jevu. Abychom vysvětlili příčiny poklesu proteolytické aktivity prostředí při sporulaci, zabývali jsme se v této práci studiem vlivu vápníku a jiných iontů na tento proces a sledovali jsme i přechod vápníku do sporulujících buněk.

Materiál a metody

Kultura. Použili jsme kmene *Bac. megatherium* ze sbírek Biologického ústavu ČSAV.

Živná půda. Složení: 0,3 % kaseinového hydrolysátu (Amigen), 0,1 % glukosy a 0,34 % KH_2PO_4. Dále jsme do 1 litru půdy přidávali 1 ml koncentrované směsi několika solí s důležitými ionty, která měla složení: 17,4 g K_2SO_4; 12,3 g $MgSO_4 . 7 H_2O$; 0,22 g $MnSO_4 . 7 H_2O$, 2,0 g $FeSO_4 . 7 H_2O$; 1,44 g $ZnSO_4 . 7 H_2O$; 18,3 g $CaCl_2 . 6 H_2O$ v 1 litru. Vzájemný poměr i obsah těchto solí jsme na základě původního návodu Greletova (1951) upravili pro kultivaci *Bac. pumilus* (Málek a sp. 1953) a převzali i pro kultivaci *Bac. megatherium.* Bez přítomnosti těchto iontů dochází k menšímu nárůstu a opoždění a zpomalení procesu sporulace (obr. 1). Připravili jsme vždy zásobní, pětkrát koncentrované roztoky živné půdy bez glukosy, které jsme před pokusem ředili a sterilisovali. Roztok glukosy jsme sterilisovali odděleně a přidávali do půd před naočkováním. pH půdy bylo 7,2.

Kultivaci, očkování, stanovení proteolytické aktivity, stupně zákalu a procenta spor jsme prováděli stejným způsobem jako v minulých pracích (Vinter 1955, 1956). Proteolytickou aktivitu jsme zjišťovali biuretovou metodou (Slavík a Smetana 1952).

Barvení spor. Spory jsme barvili malachitovou zelení a buňky dobarvovali zásaditým fuchsinem (Schmidt 1950).

Stanovení obsahu vápníku v buňkách. Pro stanovení jsme brali množství buněk, které odpovídalo 300—400 mg sušiny. Sediment jsme promývali centrifugováním ve 150—200 ml vody a stejným množstvím 0,01 N HCl, vysušili při 100 °C a mineralisovali směsí HNO_3 a $HClO_4$. U vyšších koncentrací vápníku jsme sediment promývali 0,1 N HCl. Vlastní stanovení vápníku jsme prováděli plamenovým fotometrem (VEB, Carl Zeiss, Jena, model III) podle metody již dříve popsané (Belke a Dierkesmann 1948). Při všech stanoveních obsahu vápníku v buňkách jsme pro zvýšení rozdílů přidávali do živné půdy před naočkováním přídavek 2 mg Ca na 1 litr půdy.

Výsledky

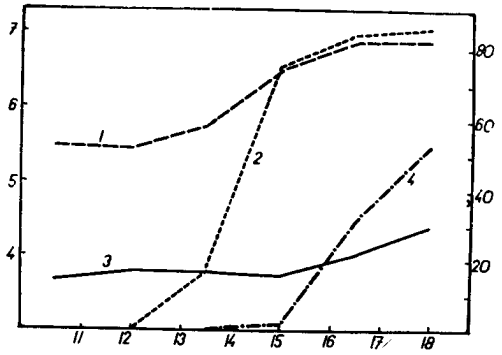
Vliv některých iontů na pokles proteolytické aktivity v mediu a na sporulaci

Všechny níže uvedené ionty jsme přidávali 12. hodinu kultivace, tedy asi 1—2 hodiny před zahájením sporulace. Přidání iontů vápníku v koncentraci $5 . 10^{-3}$ M,

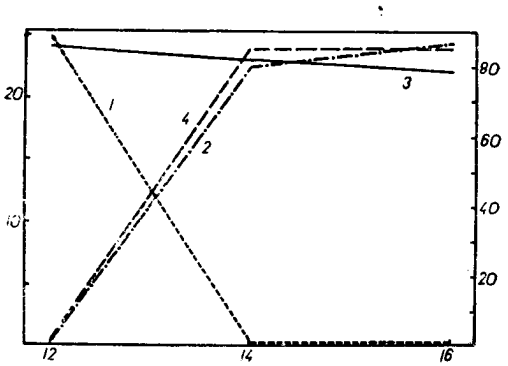
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

která se na př. pro stabilitu proteás aktinomycet osvědčila jako optimální (Chaloupka 1955), zabrání poklesu proteolytické aktivity v mediu, při čemž průběh sporulace je normální. Vápník jsme přidávali v podobě roztoku $CaCl_2$. Poklesu proteolytické aktivity zabrání i desetkrát menší koncentrace iontů Ca^{++} $5 . 10^{-4}$ M (obr. 2). Nižší koncentrace vápníku v prostředí ($5 . 10^{-6}$ M) nemá prakticky vliv, koncentrace $5 . 10^{-5}$ M pouze opozdí začátek poklesu proteolytické aktivity (tab. 1).



Obr. 1. Vliv přídavku směsi iontů na růst kultury a sporulaci. Osa x: stáří kultury v hodinách, osa y: vlevo - stupeň zákalu neředěné kultury, vpravo - procento spor v kultuře. 1 — — — stupeň zákalu na půdě s přídavkem iontů, 2 - - - - - - - - procento spor na půdě s přídavkem iontů, 3 ———— stupeň zákalu na půdě bez přídavku iontů, 4 — · — · — procento spor na půdě bez přídavku iontů.



Obr. 2. Vliv přidání Ca^{++} iontů do kultury před sporulací na další průběh proteolytické aktivity. Osa x: stáří kultury v hodinách, osa y: vlevo - proteolytická aktivita vyjádřená v mg kaseinu natráveného za 30 min., vpravo - procento spor v kultuře. 1 - - - - - - - - - - proteolytická aktivita v kultuře s přídavkem H_2O, 2 — · — · — · — procento spor v kultuře s přídavkem H_2O, 3 ——— proteolytická aktivita v kultuře s přídavkem Ca^{++} iontů, 4 — — — procento spor v kultuře s přídavkem Ca^{++} iontů.

Tabulka 1. Vliv přidání nižších koncentrací vápníku na pokles proteolytické aktivity. Proteolytická aktivita vyjádřena v mg kaseinu natráveného za 30 minut

		Stáří kultury		
		12 hod.	14 hod.	16 hod.
Kontrola (přidána H_2O)	Prot. aktivita	28,3	1,2	0,3
	Sporulace	0 %	66,8 %	81,3 %
Přidány Ca^{++} ionty v koncentraci $5 . 10^{-5}$ M	Prot. aktivita	26,2	26,8	0,6
	Sporulace	0 %	37,7 %	85,2 %
$5 . 10^{-6}$ M	Prot. aktivita	24,0	0,5	0,6
	Sporulace	0 %	67,9 %	85,9 %

Ionty Mg^{++}, o kterých je známo, že mírně stabilisují bakterijní proteásy (Gorini 1950), po přidání do kultury v podobě $MgSO_4$ (koncentrace $5 . 10^{-4}$) měly pouze slabý stabilisační vliv. Přidání iontů Mn^{++} (jako $MnCl_2$, koncentrace $1 . 10^{-3}$ M) nemá při našem složení prostředí vliv ani na pokles proteolytické aktivity, ani na sporulaci.

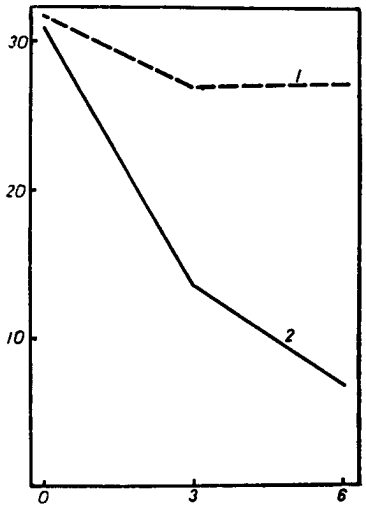
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Vliv iontů vápníku na stabilitu proteás v supernatantu

Supernatant jsme odebrali v době pokročilé sporulace a rozdělili do dvou baněk. Do jedné jsme přidali vápník v koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M, do druhé stejné množství destilované vody a obě baňky jsme dali třepat na třepačku při 29 °C. V baňce s přídavkem vápníku došlo během třepání k podstatně menšímu snížení proteolytické aktivity supernatantu než u baňky bez vápníku (obr. 3). Vápník tedy zřetelně zvýšil stabilitu proteás v supernatantu vůči třepání.

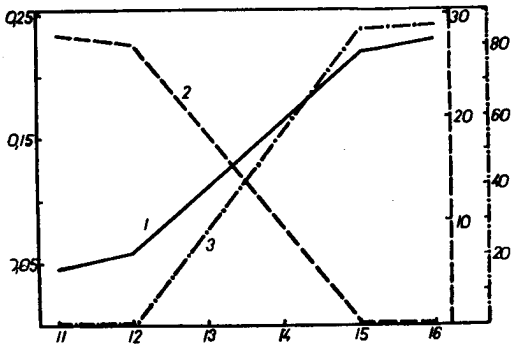
Přidání Ca^{++} iontů do vzorků supernatantu odebíraných v průběhu sporulace nevede vzhledem ke kontrolám s H_2O k zvýšení proteolytické aktivity.



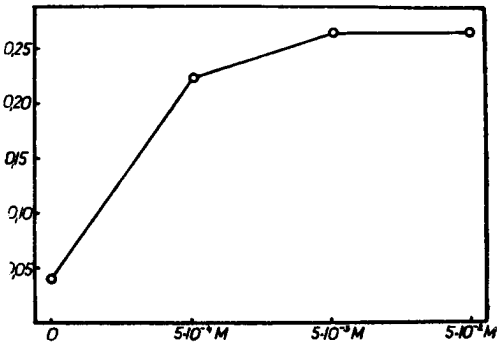
Obr. 3. Vliv Ca^{++} iontů na stabilitu enzymů v supernatantu odebraném v době pokročilé sporulace (29,6 % spor). Osa x: délka třepání supernatantu na třepačce při 29 °C v hodinách, osa y: proteolytická aktivita v mg kaseinu natráveného za 30 minut. 1 — — — supernatant s přídavkem Ca^{++} iontů, 2 ——— supernatant s přídavkem H_2O.

Přechod vápníku z media do sporulujících buněk

Obsah vápníku v buňkách před a po sporulaci jsme zjistili spektrální analysou. Na normální půdě došlo během sporulace k zvýšení obsahu vápníku v buňkách z 0,011 % na 0,041 %. Přídavek vápníku 2 mg na 1 litr živné půdy ($5 \cdot 10^{-5}$ M) zvýšil podstatně rozdíly v obsahu vápníku před a po sporulaci, nedostačoval však k udržení stability proteolytických enzymů v prostředí během sporulace. Souvislost poklesu proteolytické aktivity s vyčepáváním vápníku z media během sporulace tak zůstala zachována.



Obr. 4. Převod vápníku do sporulujících buněk a vliv tohoto procesu na proteolytickou aktivitu v mediu. Osa x: stáří kultury v hodinách. 1 ——— obsah vápníku v buňkách v procentech váhy sušiny, 2 — — — proteolytická aktivita v mg kaseinu natráveného za 30 minut, 3 — · — · — · — procento spor.



Obr. 5. Obsah vápníku v buňkách vysporulovaných v přítomnosti různých koncentrací vápníku. Osa x: koncentrace roztoku vápníku přidaného 12. hodinu do kultury (10 ml do 90 ml kultury). Osa y: obsah vápníku ve vysporulovaných buňkách (17. hodinu kultivace) v procentech váhy sušiny.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Spektrální analysa ukázala, že mezi 12. a 15. hodinou, tedy v době vytváření spor, dojde k podstatnému zvýšení obsahu vápníku v buňkách (obr. 4). Spory vytvořené v buňkách v této době mají sice již všechny optické vlastnosti spor, jsou ale ještě mladé, nemají ještě schopnost udržet barvivo při odbarvování při použití Schmidtovy (1950) metody. Tuto schopnost získávají teprve po dalších hodinách kultivace.

Jestliže jsme přidali vápník před sporulací v značně vyšších koncentracích, nedocházelo nad koncentrací $5 \cdot 10^{-4}$ M ke zvýšení obsahu vápníku ve vysporulovaných buňkách (obr. 5).

Diskuse

Z údajů literatury je známa nutnost některých iontů a solí jednak pro samotný proces sporulace u bacilů a klostridií (Curran a Evans 1954, Fabian a Bryan 1933, Foster a Heiligman 1949, Charney, Fischer a Hegarty 1951, Grelet 1952a, b, Knaysi 1945, Leifson 1931, Weinberg 1955), jednak pro aktivitu a stabilitu bakterijních proteás (Gorini a Fromageot 1949, Gorini 1950, Gorini a Crevier 1951, Levinson a Sevag 1954). Cílem této práce bylo zjistit, zda i u *Bac. megatherium* nedochází před sporulací nebo během tohoto procesu k vyčerpání některých iontů z media, které jsou nutné pro stabilitu nebo aktivitu proteolytických enzymů.

Skutečný obsah vápníku přidávaného do půdy ve směsi iontů zřejmě neodpovídá obsahu teoretickému. Vápník se může srážet nejen již ve směsi solí jako sulfát, ale i v hotové půdě jako fosfát. Sterilisace i filtrace při přípravě živné půdy vedou k dalšímu snížení obsahu vápníku. Vápník v kaseinovém substrátu zřejmě neuplatňuje při inkubaci svůj vliv na proteásy, odebrané během sporulace.

Přidání iontů manganu, který podle údajů literatury je nutný pro předsporulační období u *Bac. subtilis* (Weinberg 1955) a podle jiných údajů aktivuje proteásy *Bac. megatherium* (Levinson a Sevag 1954) nemělo při našem složení media žádný vliv ani na proteolytickou aktivitu ani na sporulaci.

Výsledky provedených pokusů ukazují, že při menším obsahu vápníku v živném mediu se projeví souvislost mezi sporulací a stavem proteolytických enzymů v mediu. Je-li v živné půdě vyšší koncentrace vápníku, než kolik ho vyžadují sporulující buňky, tato souvislost se neprojeví. Podobný vliv zvýšené hladiny vápníku v mediu na průběh proteolytické aktivity prokázal též Žofka (1955) u *Bac. cereus* var. *thuringiensis*.

Vzniká otázka, zda malý obsah vápníku v námi používané živné půdě není příčinou lability proteolytických enzymů v průběhu celé kultivace a nikoliv jen při sporulaci a zda není pokles proteolytické aktivity při sporulaci pouze výsledkem ukončení produkce proteás. Vysoká proteolytická aktivita v kultuře před sporulací by pak byla způsobena jen neustálým obnovováním hladiny enzymu v mediu v náhradu za denaturované molekuly enzymu. Tuto možnost popírají tyto zjištěné údaje:

1. Citlivost proteás ke třepání se zřetelně zvyšuje až během vlastního procesu sporulace (Vinter 1956).
2. V přítomnosti sporulujících buněk dochází k mnohem rychlejšímu poklesu proteolytické aktivity než u samotného třepaného supernatantu (Vinter 1956).
3. Značné zvýšení obsahu vápníku v buňkách během sporulace svědčí o tom, že toto množství vápníku bylo až do sporulace „k disposici" pro stabilitu proteolytických enzymů v prostředí.
4. Narušení sporulačního nebo předsporulačního mechanismu cysteinem (Vinter 1956) vede k udržení vysoké proteolytické aktivity v mediu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Vlastní důkaz zapojování vápníku do buněk v průběhu sporulace osvětluje řadu souvislostí mezi sporulací a proteolytickou aktivitou v mediu. Z literatury je již déle známo, že spory bacilů obsahují více vápníku než buňky vegetativní; schopnost akumulovat vápník je uváděna v souvislost se stupněm termoresistence vzniklých spor (Curran, Brunstetter, Myers 1943, Sugiyama 1951, Grelet 1951, 1952a, b, Powell 1953, Tinelli 1955a, b).

Naše práce ukazuje, že k převodu vápníku do buněk dochází během vytváření spor a že toto odčerpávání vápníku může vést k závažným změnám v prostředí.

Souhrn

1. Spektrální analysou jsme zjistili, že po vytvoření spor obsahují buňky *Bacillus megatherium* několikrát více vápníku než vegetativní buňky před zahájením sporulace.

2. Proteolytické enzymy produkované během vegetativního růstu *Bacillus megatherium* vyžadují pro svou stabilitu vápník.

3. K prudkému poklesu proteolytické aktivity prostředí námi již dříve zjištěnému během sporulace dochází v živné půdě, která neobsahuje více vápníku, než kolik ho spotřebují buňky *Bacillus megatherium* při vytváření spor.

4. Poklesu proteolytické aktivity na půdě chudé vápníkem lze zabránit přidáním nadbytku iontů vápníku před sporulací do kultury.

Literatura

Belke, J., Dierkesmann, A.: *Eine flammenphotometrische Methode zur Bestimmung von Na, K und Ca in biologischen Flüssigkeiten.* Arch. exp. Path. 205 : 629, 1948.

Curran, H. R., Brunstetter, B. C., Myers, A. T.: *Spectrochemical analysis of vegetative cells and spores of bacteria.* J. Bact. 45 : 485, 1943.

Curran, H. R., Evans, F. R.: *The influence of iron or manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media.* J. Bact. 67 : 489, 1954.

Fabian, F. W., Bryan, C. S.: *The influence of cations on aerobic sporogenesis in a liquid medium.* J. Bact. 26 : 543, 1933.

Foster, J. W., Heiligman, F.: *Mineral deficiences in complex organic media as limiting factors in sporulation of aerobic bacilli.* J. Bact. 57 : 613, 1949.

Gorini, L., Fromageot, C.: *Une protéinase bactérienne (Micrococcus lysodeikticus) nécessitant l'ion calcium pour son fonctionnement.* Compt. rend. 229 : 559, 1949.

Gorini, L.: *Le rôle du calcium dans l'activité et la stabilité de quelques protéinases bactériennes.* Biochim. Biophys. Acta 6 : 237, 1950.

Gorini, L., Crevier, M.: *Le comportement de la protéinase endocellulaire de Micrococcus lysodeikticus au cours de la lyse de cet organisme par lysozyme.* Biochim. Biophys. Acta 7 : 291, 1951.

Grelet, N.: *Le déterminisme de la sporulation de Bacillus megatherium. I. L'effet de l'épuisement de l'aliment carboné en milieu synthétique.* Ann. Inst. Pasteur 81 : 430, 1951. *II. L'effet de la penurie des constituants minéraux du milieu synthétique.* Ann. Inst. Pasteur 82 : 66, 1952a. *IV. Constituants mineraux du milieu synthétique nécessaires à la sporulation.* Ann. Inst. Pasteur 83 : 71, 1952b.

Chaloupka, J.: *Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus.* Čs. biologie 4 : 206, 1955.

Charney, J., Fischer, W. P., Hegarty, C. P.: *Manganese as an essential element for sporulation in the genus Bacillus.* J. Bact. 62 : 145, 1951.

Knaysi, G.: *A study of some environmental factors which control endospore formation by a strain of Bac. mycoides.* J. Bact. 49 : 473, 1945.

Leifson, E.: *Bacterial spores.* J. Bact. 21 : 331, 1931.

Levinson, H. S., Sevag, M. G.: *Manganese and the proteolytic activity of spore extracts of Bac. megaterium in relation to germination.* J. Bact. 67 : 615, 1954.

Málek, I.,: *Sporulace bacilů.* Čs. biologie 2 : 323, 1953.

Powell, J.: *Biochemical changes occuring during the germination of bacterial spores.* Biochem. J. 54 : 210, 1953.

Schmidt, C. F.: *Spore formation by thermophilic flat sour organisms. I. The effect of nutrient concentration and the presence of salts.* J. Bact. 60 : 205, 1950.

Slavík, K., Smetana, R.: *Stanovení aktivity proteolytických enzymů biuretovou reakcí.* Chem listy 46 : 649, 1952.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Sugiyma, H.: *Studies on factors affecting the heat resistance of spores of Clostridium botulinum.* J. Bact. 62 : 81, 1951.

Tinelli, R.: *Étude de la biochimie de la sporulation chez Bacillus megatherium. I. Composition des spores obtenues par carence de différents substrats carbonés.* Ann. Inst. Pasteur 88 : 212, 1955a.

Tinelli, R.: *II. Modification biochimiques et échanges gazeux accompagnant la sporulation provoquée par carence de glucose.* Ann. Inst. Pasteur 88 : 364, 1955b.

Vinter, V.: *Nerovnocennost buněk Bacillus megatherium v průběhu sporulace.* Čs. biologie 4 : 294, 1955.

Vinter, V.: *Sporulace bacilů. II. Proteolytické enzymy v průběhu sporulace Bacillus megatherium.* Čs. mikrobiologie 1 : 63, 1956.

Weinberg, E. D.: *The effect of Mn·· and antimicrobial drugs on sporulation of Bacillus subtilis in nutrient broth.* J. Bact., 70 : 289, 1955.

Žofka, P.: *Bakteriální infekce hmyzu vyvolané entomofytními kmeny Bac. cereus Frankland a Frankland.* Diplomová práce. Praha 1955.

Спорообразование бацилл. III.

Переход кальция в клетки и снижение протеолитической активности среды в течение спорообразования у Bacillus megatherium

В. Винтер

Резюме

Мы установили с помощью спектрохимического анализа, что после образования спор клетки Bacillus megatherium содержат в несколько раз больше кальция, чем вегетативные клетки до начала спорообразования. Для устойчивости протеолитических энзимов, выделяющихся в течение вегетативного роста Bacillus megatherium, требуется кальций. Наблюдавшееся нами уже ранее резкое снижение протеолитической активности среды в течение спорообразования осуществляется в такой питательной среде, которая содержит не больше кальция, чем сколько его потребуется для образования спор B. megatherium. Снижение протеолитической активности среды, бедной кальцием, можно предупредить путем прибавления к культуре избыточного количества ионов Ca^{++} до начала спорообразования.

Sporulation of Bacilli. III.

Transference of Calcium to Cells and Decrease in Proteolytic Activity in the Medium in the Process of Sporulation of Bacillus megatherium

V. Vinter

Summary

By means of spectrochemical analysis it was found that after the formation of spores, the cells of Bacillus megatherium contain several times as much calcium as the vegetative cells before the commencement of sporulation. The proteolytic enzymes produced in the course of vegetative growth of Bacillus megatherium require calcium for stability. The sharp fall in proteolytic activity of the medium, previously found by us, occurs in a nutrient medium which does not contain more calcium than is required by the cells of Bacillus megatherium when forming spores. A decrease in proteolytic activity in a calcium-deficient medium can be prevented by the addition of excess Ca^{++} ions to the medium before sporulation.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 4

Produkty látkové výměny během růstu *Clostridium acetobutylicum*

JOSEF DYR a JIŘÍ PROTIVA

Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a technologie, Praha

Došlo 22. 12. 1955

Průběh acetonbutanolového kvašení, způsobeného mikrobem *Clostridium acetobutylicum* (Weizmann), je již po desetiletí intensivně studován mikrobiology, kvasnými technology a biochemiky. Shrneme-li však dosud zjištěné skutečnosti, poznáme, že celý proces, třebaže je technologicky do určitého stupně zvládnut, není ani zdaleka tak hluboce prostudován po stránce mikrobiologické a biochemické, jako je tomu u některých jiných procesů. Jednou z hlavních příčin je ztížený laboratorní výzkum.

Clostridium acetobutylicum má zvláštní nároky na přítomnost růstových látek i obsah živin, hlavně různých forem dusíku, je striktně anaerobní a jeho vývoj prochází různými charakteristickými fázemi, projevujícími se kvalitativní změnou prostředí. První tak zvaná „kyselá" fáze je charakterisována hromaděním kyselých produktů látkové výměny, hlavně kyseliny octové a máselné. Zvyšuje se titrační acidita prostředí a hodnota pH klesá. Ve druhé „redukční" fázi se počínají tvořit neutrální produkty, převážně butanol, aceton, ethanol a obsah těkavých kyselin v prostředí klesá. Tyto změny se odrážejí ve snížení hodnoty titrační acidity a vzestupu pH prostředí. Při dobře probíhajícím kvašení se hodnoty pH a titrační acidita dále nemění. Někteří autoři mluví ještě o tak zvané třetí fázi, charakterisované mírným vzestupem křivky titrační kyselosti ke konci kvašení; v tomto období je tvořen převážně jen butanol, zatím co tvorba ethanolu a acetonu je téměř dokončena již ve druhé fázi. Dyr uvádí, že tato třetí fáze není normálním projevem a vyskytuje se za zvláštních podmínek prostředí nebo při zeslabení mikroba. Dalším charakteristickým znakem normálního průběhu kvašení je konečný poměr rozpustidel (butanolu k acetonu a ethanolu) roven 6 : 3 : 1; závisí jednak na složení živného prostředí, zvláště na druhu zkvašovaného cukru, jednak na vlastnostech použitého kmene klostridia.

Příprava aktivních kultur s trvalými fysiologickými projevy byla dlouhou dobu překážkou průzkumu základního metabolismu zmíněného mikroba. Studie vývoje a metabolismu ztěžovaly i nejasné definice přirozených projevů mikroba, když byl kultivován v laboratorních, umělých podmínkách. Teprve Daviesovi a Stephensonové (1941) se podařila příprava aktivních suspensí živého mikroba a mohlo být přikročeno k výzkumu biochemismu tvorby konečných produktů kvašení. Po výzkumech sovětských badatelů v oboru obecně biologických zákonitostí vývoje v živé přírodě bylo započato se studiem vývoje i u mikroorganismů. V tomto rámci byly řešeny i některé otázky fázovitosti v průběhu acetonbutanolového kvašení. Jsou to předně práce Ijerusalimského (1946, 1951), který studoval vývoj máselných bakterií a vývoj mikroba *Clostridium acetobutylicum*, který produkuje neutrální rozpustidla.

Dosud nejsou známy podmínky, vyvolávající přechod kultury z prvé do druhé fáze kvašení, ani nebylo zjištěno, co je příčinou změny fysiologické činnosti mikroba. Ve světové literatuře kromě sovětské nebyla tomuto zjevu věnována zvláštní pozornost. V uvedené práci Ijerusalimského je tato skutečnost vysvětlována na základě vývoje jednotlivců v kultuře během kvašení.

V této práci jsme se zabývali právě tím úsekem acetonbutanolového kvašení, kdy dochází ke změně prvé fáze v druhou, při čemž jsme soustředili pozornost jak na podmínky a stav vnějšího prostředí, tak i na stav kultury vyvolávající kvašení.

Materiál a metody

Ve svých pokusech jsme použili produkční kultury *Clostridium acetobutylicum*, kmen Ca 3, isolované Dyrem v roce 1946. Ze zásobní kultury jsme připravili konservy spor na směsi 1 dílu zeminy a 1 dílu prosátého písku. Před uzavřením jsme konservy vysušili nad chloridem vápenatým. Konservy uzavřené

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

parafinem jsme uložili v chladnici při + 4 °C. Kmen Ca 3 zachovává na živné půdě dále uvedené poměr butanolu k acetonu přibližně 2 : 1, tvoří však méně ethylalkoholu, což ale není považováno za projev horšího průběhu kvašení. Vegetativní inokula jsme rozvedli pro všechny pokusy z jedné konservy spor.

Všechny pokusy jsme konali na komplexní tekuté půdě založené na Speakmanově směsi solí: K_2HPO_4 — 0,1 %; $MgSO_4 . 7 H_2O$ — 0,02 %; $FeSO_4 . 7 H_2O$ — 0,001 %; $MnSO_4 . 4 H_2O$ — 0,001 %; NaCl — 0,001 %. K 750 ml roztoku těchto solí se přidá 200 ml hlízové vody ze 120 g brambor, 40 g glukosy, 4 ml kvasničného autolysátu podle Weizmanna a 5 g kukuřičného extraktu (55 % sušiny). Objem se doplní na 1 litr.

Hlízovou vodu z brambor jsme připravili takto: jemně roztrouhané brambory jsme vylisovali a promyli vodou. Hlízovou šťávu a promývací vodu jsme slili. Obsažený škrob jsme odstředili, bílkoviny srazitelné varem jsme odstranili vařením v páře po dobu 30 min. a odstředěním. Hnědě zbarvené průhledné tekutiny jsme použili pro přípravu půdy. pH půdy před sterilisací jsme upravili na 6,0. Půdu jsme sterilisovali 30 minut v autoklávu v páře při přetlaku 1 atm. Po sterilisaci jsme ji prudce ochladili proudem vody na 35 až 38 °C a ihned zaočkovali vegetativním inokulem 20 hodin starým. Inokulum činilo 2 % konečného objemu živné půdy. Pro přípravu inokula jsme použili zkumavky s bramborovou záparou, zaočkované několika zrnky směsi hlíny a písku z konservy spor, podrobené tepelnému nárazu po dobu 120 vteřin. Zkumavky měly rozměr 16 × 180 mm. Kultivovali jsme je při 37—38 °C. Vzorky během kvašení jsme odebírali skleněnou trubičkou zasahující do živného prostředí přetlakem sterilního kysličníku uhličitého.

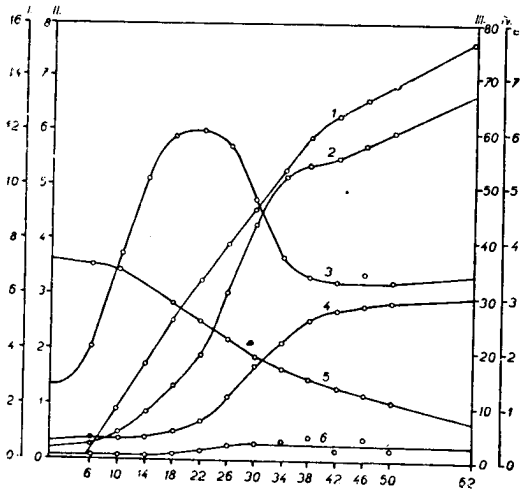
Butanol a ethanol jsme stanovili podle Johnsona (1932), aceton jodometricky podle Goodwina (1920). Kyselinu máselnou a octovou jsme stanovili v alkalickém zbytku po oddestilování neutrálních produktů týmž postupem jako butanol a ethanol, s výjimkou oxydační operace. Ke vzorkům do destilační zkumavky jsme přidávali místo oxydačního činidla roztok 73,4 g K_2SO_4 v 1000 ml 5 n H_2SO_4. Pro výpočet jsme experimentálně stanovili destilační konstanty podobně jako Johnson (1932) pro butanol a aceton. Glukosu jsme stanovili metodou Shaffer-Hartmannovou (1921). Sušinu mikroorganismů jsme stanovili odstředěním 25 ml kultivačního media, promytím destilovanou vodou a sušením při 105 °C.

Titrační aciditu jsme zjišťovali titrací 10 ml odstředěného živného prostředí 0,1 n KOH na fenolftalein.

pH jsme měřili chinhydronovou elektrodou na elektronkovém potenciometru typu Multoscop II. Redox potenciál jsme měřili platinovou elektrodou na potenciometru se zrcátkovým galvanoměrem jako nulovým přístrojem (L. Schiltknecht, Zürich). Referentní elektrodou byla nasycená kalomelová elektroda. Měřili jsme při 30 °C. Jako zdroj standardního napětí jsme používali normálního Westonova článku. K naměřeným hodnotám jsme přičetli 250 mV. Vzorky pro měření se již během odběru z kvasné nádoby pokryly vysokou vrstvou husté pěny, která omezovala styk měřené kapaliny se vzduchem.

Výsledky

Vlastní pokusnou část práce jsme zahájili sledováním průběhu kvasné křivky kultury Ca3 na uvedené živné půdě. Bylo třeba zjistit, zda průběh kultivace a tvorba konečných produktů probíhá podobně jako na přirozených půdách. Na obr. 1. jsou výsledky jednoho z pokusů. Doba kvašení 60 hodin je obvyklou kvasnou dobou dosahovanou v laboratorních pokusech s několikalitrovými objemy. Také křivky titrační acidity, vyjadřující hromadění organických, převážně těkavých, kyselin měly normální průběh se dvěma zlomy. První zlom (na grafu



Obr. 1. Kvasné křivky *Clostridium acetobutylicum*, kmen Ca 3.

Křivky: 1 — plyn, 2 — butanol, 3 — acidita, 4 — aceton, 5 — glukosa, 6 — ethanol. Osa x : kultivace v hod., osa y : I — kvasné plyny l/l media, II — acidita, III — glukosa v mg/ml, IV — rozpustidla v mg/ml.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

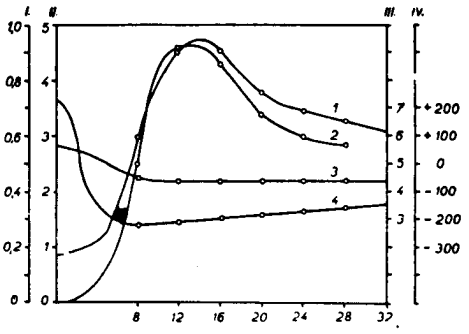
mezi 18. a 22. hodinou) se všeobecně považuje za znak přechodu kvašení do druhé fáze. Celkový výtěžek rozpustidel v provozní praxi bývá kolem 32 %, počítáno na vnesený cukr. V našem případě, po odečtení produktů vnesených inokulem, vychází výtěžnost 31 % na zkvašenou glukosu. Po zjištění těchto skutečností jsme mohli srovnávat kvašení na použitém tekutém mediu s kvašením na škrobnatých záparách obvykle používaných.

Tab. 1. Vliv stáří kultury na tvorbu produktů látkové výměny

Mg/ml	Stáří kultury 10 hodin			Stáří kultury 24 hodin		
	před inkubací	po inkubaci	rozdíl	před inkubací	po inkubaci	rozdíl
Glukosa	30,40	22,65	— 7,75	20,90	13,87	— 7,03
Kys. octová	2,44	2,19	— 0,25	2,14	2,58	+ 0,44
Kys. máselná	0,62	2,35	+ 1,73	0,62	0,01	— 0,61
Butanol	0,18	0,80	+ 0,62	2,66	4,14	+ 1,48
Aceton	0,19	0,27	+ 0,08	0,90	1,35	+ 0,45
Ethanol	0,55	0,79	+ 0,24	0,92	1,74	+ 0,82
Acidita	2,80	—	—	3,25	—	—
Sušina	—	4,65	—	—	5,65	—

Po tomto základním pokusu jsme mohli přistoupit ke sledování rozdílů v metabolismu kultury v průběhu prvé a druhé fáze kvašení. Tyto rozdíly lze jen zhruba odhadnout z průběhu křivek acidity a neutrálních produktů během kvašení. Pro zjištění závislosti biochemické činnosti na stáří a na stavu podmínek vnějšího prostředí je však třeba kvalitativně a kvantitativně analysovat produkty látkové výměny vznikající činností mikroba v určitém, pokud možno krátkém časovém intervalu.

Založili jsme proto pokus se zkoncentrovanou kulturou mikroba isolovanou z prvé a druhé fáze kvašení. 250 ml kvasícího media, starého 10 hodin, jsme odebrali a buňky odstředili 15 min. při 3000 ot/min. Medium prosté buněk jsme přetlačili z kyvety dusíkem až asi na 25 ml, v němž byly buňky opět suspendovány. Kulturu zhuštěnou takto téměř desetinásobně jsme inkubovali 2 hod. při 37 °C. Stejným postupem jsme připravili koncentrovanou kulturu starou 24 hodin, procházející začátkem druhé fáze kvašení. Z rozdílů výsledků analys kultivační půdy před a po inkubaci jsme získali údaje o biochemické činnosti kultury ve značně krátkém časovém intervalu a tak jsme ve velké míře vyloučili faktor plynulé změny metabolismu při přechodu z prvé do druhé fáze kvašení. Srovnání údajů biochemické činnosti kultury v prvé a druhé fázi kvašení je uvedeno v tabulce 1. Pokus jsme opakovali stejným způsobem, aniž bychom zjistili podstatnou změnu v kvantitativních poměrech analysovaných vzorků. Z tabulky je zřejmé, že se obě kultury liší v produktech metabolismu, zvláště v poměru k máselné a octové kyselině.



Obr. 2. Vztah mezi podmínkami prostředí a růstem kultury *Clostridium acetobutylicum*. Křivky: 1 — acidita, 2 — sušina, 3 — pH, 4 — Eh (30 °).

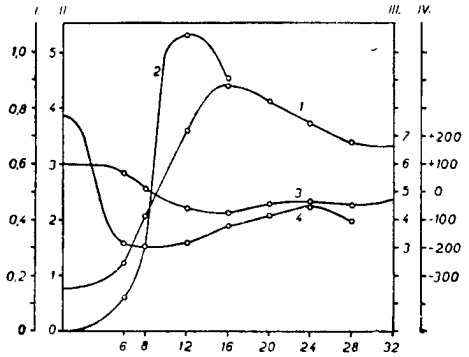
Zajímala nás otázka podmínek prostředí, v němž se kultura během svého rozvoje

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

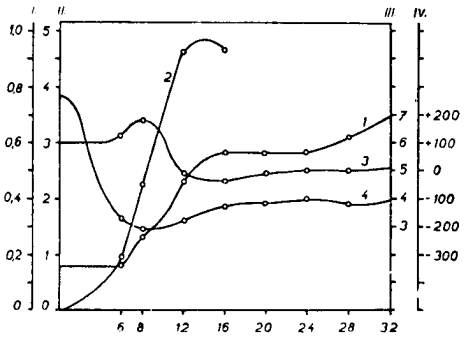
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

nachází a které prostřednictvím své látkové výměny assimiluje a mění. Ovlivněním nebo změnou jednotlivých sledovaných podmínek prostředí chtěli jsme zjistit ty nutné podmínky, které vyvolávají (nebo spolupůsobí) přechod kultury do druhé, produkční fáze kvašení.

Připravili jsme čtyři stejné pokusy, v nichž jsme sledovali hodnoty redox potenciálu a pH, průběh tvorby kyselin a postup vytváření bakterijní hmoty v období prvé a druhé fáze. Za znak přechodu kultury do druhé fáze kvašení jsme považovali zlom v křivce titrační acidity. Baňky obsahující po 1500 ml tekutého media jsme



Obr. 3a. Kontrola.



Obr. 3b. Vznikající kyseliny částečně neutralisovány uhličitanem sodným.

Vztah mezi křivkami sušiny a titrační acidity během kultivace *Clostridium acetobutylicum*. Křivky: 1 — acidita, 2 — sušina, 3 — pH, 4 — Eh. Osa x : kultivace v hod. Osa y : I — sušina v mg/ml, II — acidita, III — pH, IV — Eh (30 °).

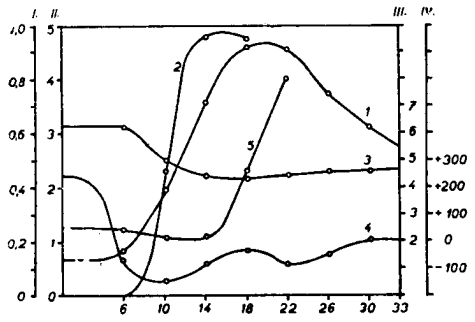
zaočkovali 30 ml vegetativního inokula starého 20 hodin. Počínaje osmou hodinou kvašení odebírali jsme vzorky každou čtvrtou hodinu a zjišťovali jsme titrační aciditu, pH, Eh a bakterijní sušinu. Průběhy křivek uvedených na obr. 2 se shodují s ostatními třemi paralelními pokusy. Ve všech případech došlo ke zlomu titrační acidity mezi 12. a 16. hodinou kvašení. Tomu odpovídá i křivka pH, která se po počátečním poklesu udržuje během druhé fáze na stejných hodnotách. Křivka Eh prudce klesá již v prvních hodinách do záporných hodnot a láme se dříve, než dosáhne křivka acidity vrcholu. V dalších hodinách kultivace jen mírně stoupá. Velmi zajímavý průběh má křivka sušiny. Ve všech případech měla poměrně ostrý vrchol a dosahovala maxima vždy před zlomem křivky acidity. To znamená, že k množení bakterií a nárůstu mikrobní masy dochází pouze v prvé fázi. Kromě křivky sušiny a titrační acidity nenastaly v ostatních měřených veličinách změny takové velikosti, které by mohly být příčinou změny fysiologické činnosti kultury. Ze všech sledovaných změn v kultuře se mění pouze množství sušiny a velikosti titrační acidity v období přechodu fází do takové míry, že by mohly být příčinou změny v biochemické činnosti mikroba.

Abychom určili, zda je přechod kultury do druhé fáze závislý na nahromadění určitého množství volných kyselin, nebo zda tvorba neutrálních rozpustidel nastává z důvodů energetických až v době, kdy kultura přestává syntetisovat živou hmotu a množit se, oddělili jsme v dalších pokusech průběh křivek titrační acidity a sušiny tím, že jsme část organických kyselin, tvořených v prvních hodinách kvašení, neutralisovali. Nejprve jsme použili uhličitanu sodného, který jsme přidali na třikrát během prvních deseti hodin kvašení. Výsledky z tohoto pokusu jsou uvedeny ve srovnání s kontrolou bez přidání uhličitanu na obr. 3a a 3b. Kontrolní kvašení

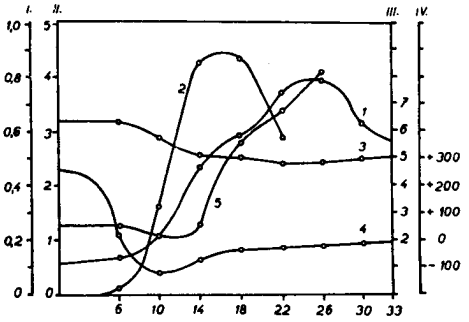
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

probíhalo normálním způsobem s maximem sušiny a vrcholem křivky titrační acidity mezi 12. a 16. hodinou. Následkem neutralisace kyselin na počátku kvašení se změnila jen křivka titrační acidity a pH. Křivky redox potenciálu a sušiny probíhají podobně jako v kontrole. Titrační acidita v době, kdy končí množení a růst klostridií, je značně nižší a nevrcholí, nýbrž se po osmihodinové prodlevě dále zvyšuje. To svědčí pro domněnku, že velikost titrační acidity anebo množství volných kyselých produktů látkové přeměny není činitelem, který je příčinou zastavení množení mikrobů a přechodu kvašení do druhé redukční fáze.



Obr. 4a. Kontrola.



Obr. 4b. Vznikající kyseliny neutralisovány uhličitanem vápenatým.

Vliv velikosti sušiny a titrační acidity na přechod kultury *Clostridium acetobutylicum* do druhé „redukční" fáze. Křivky: 1 — acidita, 2 — sušina, 3 — pH, 4 — Eh, 5 — aceton. Osa x : kultivace v hod. Osa y : I — aceton, sušina v mg/ml, II — acidita, III — pH, IV — Eh (30 °).

Výsledky z pokusu s jednorázovou neutralisací vznikajících kyselin mírným nadbytkem uhličitanu vápenatého jsou uvedeny spolu s kontrolním kvašením na obr. 4a a 4b. V tomto pokusu jsme rovněž sledovali tvorbu acetonu, který je charakteristickým produktem látkové přeměny ve druhé fázi kvašení, jak jsme ukázali výše. V tomto pokusu jsme ozřejmili vztah mezi hodnotou titrační acidity, růstem klostridií a tvorbou acetonu. V kontrolním pokusu dochází k tvorbě acetonu po dosažení maxima sušiny, to je ještě v době, kdy přibývá těkavých kyselin v prostředí. Již z toho bychom mohli soudit, že doba zlomu křivky titrační acidity není shodná s přechodem fází. Tato domněnka je upevněna vzájemnými vztahy výše uvedených hodnot při kvašení probíhajícím z počátku za přítomnosti uhličitanu vápenatého. Tam došlo ke zlomu titrační acidity až kolem 26. hodiny, zatím co křivka sušiny vrcholí mezi 14. a 18. hodinou. Tvorba acetonu charakterisující druhou fázi kvašení začíná intensivně od 14. hodiny a je zřejmě závislá pouze na přechodu kultury do stacionárního (klidového) období.

Diskuse

V této práci jsme zjišťovali závislost mezi narůstáním bakterijní hmoty u *Clostridium acetobutylicum*, změnou reakce prostředí a produkcí oxydovaných a redukovaných forem metabolitů. Ze získaných výsledků nelze ještě činit závěry o vývoji tohoto mikroba. Naší snahou bylo zjistit podmínky nutné pro přechod kultury z prvé „kyselé" fáze do druhé produkční fáze, především z důvodů praktických.

Z literatury i z vlastní zkušenosti víme, že kritickým obdobím celého acetonbutanolového kvašení je jeho první fáze, kdy je kultura velmi citlivá na vnější vlivy a velmi málo odolná proti infekci. Pouze zjištěním optimálních podmínek pro

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

dovršení první fáze a pro přechod do fáze produkční zaručíme dobrý průběh a maximální výtěžek neutrálních produktů.

Z biochemické činnosti kultury v prvé a druhé fázi kvašení jsme získali obraz změny v enzymatickém systému mikroba během kvašení. Považujeme-li kyselinu octovou za předchůdce kyseliny máselné, což bylo dokázáno v několika pracích (Wood, Brown a Werkmann 1945, Davies 1942), je zřejmé, že v prvých hodinách kvašení je produktem látkové přeměny především kyselina octová, která se hromadí. Ještě v desáté hodině je poměr octové kyseliny k máselné kyselině značně posunut ve prospěch kyseliny octové; v této době je však kyselina octová rychle přeměňována na kyselinu máselnou, což se projeví úbytkem celkového množství kyseliny octové a značným přírůstkem kyseliny máselné při dvouhodinové inkubaci zkoncentrované kultury. Druhý způsob přeměny kyseliny octové, totiž na aceton, probíhá v této fázi jen velmi pomalu. Zato tvorba butanolu a ethanolu probíhá v jisté míře už před zlomem křivky titrační acidity. Ve druhé fázi kvašení se tvoří ve větší míře neutrální produkty, zvláště butanol. V souvislosti s tím je zpracována kyselina máselná rychleji než se tvoří z kyseliny octové. Naproti tomu samotná kyselina octová se hromadí a je tak zdrojem i pro tvorbu acetonu a případně i ethanolu. Je zřejmé, že jediným charakteristickým produktem druhé fáze kvašení je aceton. Ethanol a butanol se tvoří i v prvé „kyselé" fázi kvašení, i když v malém množství. Znakem přechodu kultury do druhé fáze kvašení je stoupající tvorba acetonu. Z našich pokusů s neutralisací kyselin, hromadících se v prvé fázi vyplynulo, že pro přechod kultury do druhé fáze není rozhodující množství volných kyselin a tím i v jistém rozsahu změna pH. Změny hodnoty pH mohou mít vliv na rychlost jednotlivých dílčích reakcí, jsou-li dostatečně velké. Avšak rozdíly pH, které jsme naměřili, nevysvětlují nijak objevení se schopnosti tvořit aceton ve druhé fázi kvašení. Podobně je tomu i s velikostí redox potenciálu; jeho změna se zdá být spojena s prudkým množením mikroorganismů, jak to uvádí Hewitt (1950). Redox potenciál je pro striktní anaeroby spíše limitujícím faktorem v prvních hodinách růstu mikrobů v čerstvém kultivačním prostředí. Příčinou změny metabolismu není tedy posunutí rovnováh těch enzymatických reakcí, kterými je přeměňován centrální produkt látkové výměny *Clostridium acetobutylicum* (podle novějších názorů kyselina octová nebo její aktivní forma) na kyselinu máselnou nebo na kyselinu acetooctovou. Soustředili jsme se proto na množení kultury, kde průběh respektive dokončení logaritmické fáze souhlasilo v našich pokusech s dobou přechodu fází a s počínající tvorbou acetonu.

V dřívějších pracích Peterson a Fred (1932) a v novějších Ijerusalimskij (1946) uvádějí křivku počtu mikrobů v průběhu kvašení. Dosud však nebyl růst mikroba uveden do příčinného vztahu s fázovitostí acetonbutanolového kvašení. Ve své práci jsme nezjišťovali množství bakterií počítáním a vyčíslením v určitém objemu, neboť bychom nezískali představu o intensitě tvorby buněčné hmoty a o rozsahu syntetické činnosti uvnitř buňky. Domníváme se, že příčinou hromadění energeticky chudších látek v prostředí (oxydované formy) je zvýšená spotřeba energie pro syntesu buněčné hmoty, která v první fázi logaritmicky narůstá. Teprve po dokončení množení a růstu buněk v kultuře nastupuje druhá fáze kvašení charakterisovaná tvorbou redukovaných produktů, totiž ethanolu a butanolu.

Považujeme proto za hlavní podmínku dobrého průběhu acetonbutanolového kvašení zajištění optimálních poměrů pro rychlý rozvoj kultury a zvláště přípravu aktivních, rychle se množících produkčních kmenů *Clostridium acetobutylicum*.

Souhrn

Při studiu fysiologické činnosti mikroba *Clostridium acetobutylicum* v prvé a druhé

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

fázi acetonbutanolového kvašení jsme zjistili, že pouze aceton je produkt charakterisující přechod kultury do produkční fáze kvašení.

K přechodu do druhé, produkční fáze kvašení dochází až po dokončení množení a růstu buněk v kultuře, nezávisle na množství nahromaděných volných kyselin v prostředí.

Změna v průběhu křivky titrační acidity, všeobecně spojovaná s přechodem kvašení do druhé fáze, je podle výsledků našich pokusů důsledkem změn fysiologické činnosti kultury po dokončení jejího růstu a množení.

Literatura

Davies, R.: *Studies on the acetone-butylalcohol fermentation. 2. Intermediates in the fermentation of glucose by Cl. acetobutylicum. 3. Potassium as an essential factor in the fermentation of maize meal by Cl. acetobutylicum.* Biochem. J., 36 : 582, 1942.

Davies, R., Stephenson, M.: *Studies on the aceton-butyl alcohol fermentation. 1. Nutritional and other factors involved in the preparation of active suspension of Cl. acetobutylicum.* Biochem. J., 36 : 1320, 1941.

Dyr, J.: *Výroba organických rozpustidel kvasnou cestou.* Sborník prednášok V. časť, Bánská Štiavnica 1954 (str. 59).

Goodwin, L. F.: *Modification of the Messinger method for aceton determination.* Am. Chem. Soc., 42 : 39, 1920.

Hewitt, L. F.: *Oxidation-reduction potencials in bacteriology and biochemistry.* Edinburgh. 1950.

Ijerusalimskij, N. D.: *O fiziologičeskich stadijach v razvitiji bakterij.* Mikrobiologija 15 : 406, 1946.

Ijerusalimskij, N. D.: *Ontogenetičeskoje razvitije kultury masljanokislych bakterij.* Mikrobiologija, 20 : 204, 1951.

Johnson, M. J.: *Determination of small amounts of ethyl and butyl alcohols.* Ind. Eng. Chem., 4 : 20, 1932.

Peterson, W., Fred, E. B.: *The butanol-aceton fermentation of corn-mash.* Ind. Eng. Chem. 24 : 237, 1932.

Shaffer, P. A., Hartmann, A. F.: *The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis II.* J. Biol. Chem., 45 : 365, 1921.

Wood, H. G., Brown, R. W., Werkmann, C. H.: *Mechanism of the butyl alcohol fermentation with heavy carbon acetic and butyric acids and acetone.* Arch. Biochem., 6 : 243, 1945.

Продукты обмена веществ в течение роста Clostridium acetobutylicum

И. Дыр и И. Протива

Резюме

Исследуя физиологию жизнедеятельности микроба Clostridium acetobutylicum в первой и во второй фазах ацетонбутанолового брожения, мы установили, что только ацетон является продуктом, характеризующим вступление культуры в продуктивную фазу брожения. — Переход во вторую, производительную фазу брожения осуществляется только после окончания роста и размножения клеток в культуре, — независимо от количества накопившихся в среде свободных кислот. — Изменения в ходе кривой титруемой кислотности, которые принято сопоставлять со вступлением брожения во вторую фазу, являются, судя по результатам наших опытов, последствием физиологических изменений жизнедеятельности культуры после окончания ее роста и размножения.

Products of Metabolism during the Growth of Clostridium acetobutylicum

J. Dyr and J. Protiva

Summary

It was found, from the physiological activity of Clostridium acetobutylicum in the first and second phase of acetonbutanol fermentation, that only acetone is the product characterising the transition of the culture into the production phase of fermentation. Transition into the second, production phase of fermentation occurs only after proliferation and growth of the cells in the culture is complete, independently of the amount of free acids which have accumulated in the environment. According to the results of our experiments, the change in the course of the titration curve of acidity, which is generally combined with the transition of fermentation into the second phase, is due to changes in the physiological activity of the culture following completion of growth and proliferation.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 4

Kultivační charakteristiky desulfurikačních bakterií z naftových ložisek

MILAN DOSTÁLEK a MILOŠ SPURNÝ

Ústav pro naftový výzkum, biochemické oddělení, Brno

Došlo 15. 2. 1956

Desulfurikační bakterie je možno považovat za nejvýznamnější skupinu mikroorganismů, žijících v naftových ložiskách.

Ginzburg-Karagičeva (1926) a Bastin (1926) zjistili v převážné většině vzorků naftových vod četné zástupce rodu *Desulfovibrio* a ve svých dalších pracích dokázali, že s činností těchto bakterií souvisí nízký obsah síranů a výskyt sirovodíku v typických vodách naftových ložisek (Ginzburg-Karagičeva 1933, Bastin a Greer 1930, Ginter 1930). Významnou vlastností desulfurikačních bakterií je jejich vztah k naftovým uhlovodíkům. Celá řada autorů dokázala, že bakterie rodu *Desulfovibrio* rozkládají nejrůznější kapalné uhlovodíky obsažené v naftě a způsobují tak změny v chemickém složení i fysikálních charakteristikách suroviny (Tauson a Alešina 1932, Novelli a ZoBell 1944, ZoBell 1950). Uspenskij, Gorskaja a Karpova (1947) soudí, že s aktivitou desulfurikačních bakterií souvisí různý charakter naft, nalézaných v různých hloubkách v téže naftonosné oblasti. Desulfurikačním bakteriím se přičítá také důležitá úloha při genesi nafty (Porfirjev 1948, Radčenko 1951, Jankowski a ZoBell 1944). Podkladem pro tyto úvahy jsou zejména zjištění, že tyto bakterie produkují kapalné uhlovodíky při asimilaci mastných kyselin. ZoBell (1947) také dokázal, že desulfurikační bakterie přispívají k uvolňování adsorbované nafty z naftonosných hornin. Na základě tohoto pozorování se stávají tyto bakterie také nejvýznamnější bakterijní skupinou pro využití mikrobiologických metod při těžbě nafty.

Po zjištění desulfurikačních bakterií ve vodách naftových ložisek v ČSR jsme začali tuto fysiologickou skupinu podrobněji studovat. První výzkumné práce, které shrnuje toto sdělení, byly zaměřeny ke zjištění podkladů pro laboratorní kultivaci ložiskových desulfurikačních bakterií.

Materiál a metody

Pro nahromadění desulfurikačních bakterií ze vzorků naftových vod i k jejich další kultivaci jsme použili živného roztoku tohoto složení: K_2HPO_4 0,1 %; NH_4Cl 0,1 %; $CaCl_2$ 0,01 %; $MgCl_2$ 0,01 %; Na_2SO_4 0,1 %; Na_2SO_3 0,02 %; mléčnan amonný 70 % 0,5 ml/100 ml živné půdy; kvasničný extrakt 10 mg/100 ml živné půdy.

Výchozí pH živného roztoku po sterilisaci bylo upravováno na 7,0 a oxydoredukční potenciál na hodnotu E_h kolem + 50 mV. Pro některé pokusy jsme tuto živnou půdu zvlášť upravili, jak uvádíme podrobněji při popisu prací. Pro stanovení délky lag-fáze jsme živnou půdu obohatili stopami Fe^{++}, což umožňovalo visuální indikaci vzniku sirovodíku (sraženina FeS).

Ke kultivaci jsme používali dobře těsnících reagenčních lahví obsahu 50 ml se zabroušenou zátkou. Pro nahromaďovací kultury, získávané z naftových vod, jsme upravovali prostředí ještě přídavkem železných hoblin (podle návrhu Ing. J. Bárty z Výzkumného ústavu kvasného průmyslu).

Jako inokula jsme používali kultur desulfurikačních bakterií předkultivovaných v živném roztoku s mléčnanem po dobu 3 dnů. Objem použitého inokula činil 0,5 % objemu očkované půdy; 1 ml inokula obsahoval přibližně 10^7 bakterií. Dobu kultivace jsme volili podle potřeby jednotlivých pokusů; nepřesahovala zpravidla 6 dní. Kultury byly inkubovány v termostatu při teplotě 32 °C. Počet bakterií jsme stanovili přímou mikroskopickou metodou.

Reprodukovatelnost výsledků, získaných touto metodou, byla ověřena srovnáním se stanovením počtu desulfurikačních bakterií zřeďovací metodou v živném roztoku s mléčnanem.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Délku fáze zdržení (lag-fáze) ve vývoji kultury jsme zjišťovali podle výskytu prvních stop černého sedimentu (FeS) v kulturách, opatřených stopami železa. Proto jsme pěstovali bakterie paralelně v živných půdách s Fe^{++} (pro stanovení lag-fáze) a bez Fe^{++} (pro polarografické stanovení H_2S). V průběhu lag-fáze a logaritmické fáze, které byly pro naše pokusy rozhodující, jsme nezjistili podstatných rozdílů ve vývoji desulfurikačních bakterií na obou druzích živných půd.

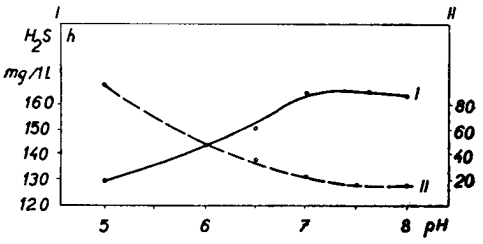
H_2S v kulturách jsme stanovili polarograficky, pomocí měření anodické vlny v prostředí 0,1 n NaOH (Hemala, Marek a Valčíková 1955).

Pro získání dostatečného výběru materiálu pro testování kultivačních podmínek jsme nahromadili desulfurikační bakterie z 89 vzorků ložiskových vod, odebraných ze 6 naftonosných oblastí. V 85 % případů jsme zjistili výskyt bakterií rodu *Desulfovibrio*. Získané nahromaďovací kultury jsme přeočkovávali za standardních podmínek 6 až 12krát a v průběhu jejich kultivace jsme sledovali délku lag-fáze. Od čtvrtého přeočkování nabývala ve většině případů lag-fáze určitého rozpětí, které se již při dalších přeočkováních podstatně neměnilo. U převážné většiny získaných kultur trvala lag-fáze asi 18 hodin. Z této skupiny kultur byla vybrána kultura pro další pokusné práce. Při mikroskopickém pozorování této kultury (obr. 1 a 2) jsme zjistili typické vibriové formy. Buňky jiných druhů, které by ukazovaly na znečištění kultury, jsme prakticky nenalezli. Při kontrole čistoty na MPA jsme však zjistili, že bakterie rodu *Desulfovibrio* jsou v kultuře provázeny gramnegativními sporulujícími mikroorganismy a grampositivními koky (obr. 3, 4). Oba průvodní mikroorganismy se vyskytovaly v kulturách desulfurikačních bakterií zákonitě při postupném přeočkování a jejich koncentrace v kulturách byla zhruba o 2 řády nižší než koncentrace bakterií rodu *Desulfovibrio*. Po stránce fysiologické měla tato směsná kultura při kultivaci na standardní půdě s mléčnanem stálé vlastnosti (délka lag-fáze, intensita redukce síranů a produkce H_2S).

Výsledky

Vliv výchozího pH a E_h prostředí

Pro tyto práce jsme použili živného roztoku s mléčnanem, upraveného po sterilisaci na žádané pH n/10 NaOH nebo n/10 HCl. Při sledování vlivu výchozího pH jsme neupravovali výchozí oxydoredukční potenciál živného roztoku (E_h + 350 mV při pH 7). Při pokusech sledujících vliv redoxpotenciálu jsme pracovali s půdou, mající pH 7. Oxydoredukční potenciál byl upravován 3% roztokem thioglykolátu amonného. Pro každou obměnu živné půdy jsme zařadili tři opakování. Výsledky pozorování jsou zřejmé z obr. 5 a tab. 1.



Obr. 5. Vliv výchozího pH na vývoj desulfurikačních bakterií. Křivka I — produkce sirovodíku (mg/l) za 6 dní. Křivka II - délka lag-fáze (hod.).

Tab. 1. Vliv výchozího E_h

Výchozí E_h	Délka lag-fáze hod.	Množství H_2S po 6 dnech mg/l
+ 350	36	149,5 ± 3,5
+ 202	24	151,5 ± 3,1
+ 110	24	165,2 ± 3,1
0	18	167,2 ± 2,8
− 22	18	168,3 ± 3,2
− 40	18	165,2 ± 3,2
− 60	24	165,3 ± 2,9
− 101	24	163,2 ± 3,6

Tab. 3. Vliv stáří kultury

Stáří předkultiv. kultury ve dnech	Délka lag-fáze očkované kultury
2	20 hod.
3	24 hod.
4	30 hod.
5	36 hod.
6	38 hod.
7	38 hod.
10	5 dní
12	8 dní
16	13 dní

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Vliv kvasničného extraktu

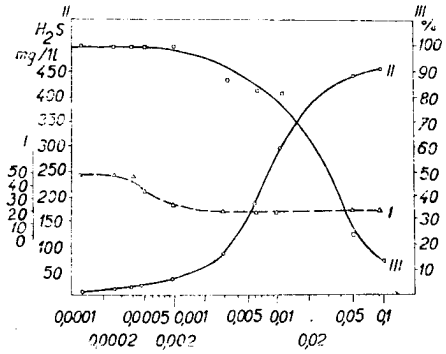
Pro pokusy jsme použili zahuštěného kvasničného extraktu amerického původu (bez udání výrobce). 1% roztok kvasničného extraktu jsme přidávali k živné půdě s mléčnanem po sterilisaci. Každá obměna živné půdy byla zařazena ve 4 opakováních. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2. Koncentrace kvasničného extraktu jsou vyjádřeny v miligramech sušiny na 100 ml živného roztoku.

Tab. 2. Vliv kvasničného extraktu

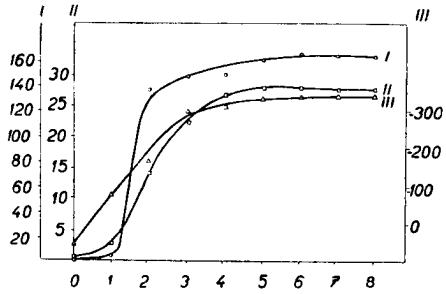
Kvasničný extrakt mg/100 ml	Délka lag-fáze v hod.	H_2S po 6 dnech mg/l
0	48	150,4 ± 3,5
0,2	48	149,2 ± 4,2
0,5	48	146,4 ± 3,8
1	24	155,1 ± 3,9
3	24	158,1 ± 4,2
5	18	195,0 ± 5,2
10	18	182,2 ± 4,2
15	18	179,0 ± 4,2
20	18	170,3 ± 3,8
25	18	170,5 ± 3,9
30	18	171,2 ± 2,3
50	18	172,1 ± 4,2
100	18	174,2 ± 3,2

Vliv koncentrace síranů v prostředí

Ke zjištění vlivu koncentrace síranů na vývoj desulfurikačních bakterií jsme použili živné půdy s mléčnanem s odstupňovanými dávkami síranu sodného. Pro přípravu živného roztoku jsme použili stupně čistoty „pro analysi" s výjimkou mléčnanu amonného, který v této čistotě nebyl dosažitelný. Pro každou obměnu živné půdy byla zařazena 4 opakování. Výsledky jsou uvedeny na obr. 6.



Obr. 6. Vliv koncentrace síranu v prostředí. Osa x : log koncentrace $Na_2SO_4 . 10 H_2O$ (mol.) v živném prostředí. Křivka I - délka lag-fáze (hod.). Křivka II - produkce sirovodíku (mg/l) po 6 dnech kultivace. Křivka III - procento využití síranu.



Obr. 7. Růstové charakteristiky desulfurikačních bakterií. Osa x : počet dní kultivace. Křivka I - produkce sirovodíku mg/l. Křivka II - počet bakterií ve stomilionech (10^8). Křivka III - oxydoredukční potenciál (mV při pH 7).

Růstové charakteristiky

Pro zjištění možnosti hodnocení intensity vývoje kultury desulfurikačních bakterií jsme sledovali v průběhu kultivace tyto charakteristiky: 1. Počet bakterií. 2. Množství produkovaného H_2S. 3. Změny oxydoredukčního potenciálu. V pokusu jsme použili živného roztoku s mléčnanem, jehož pH bylo upraveno na 7,0 a oxydoredukční potenciál na E_h + 48 mV. Charakteristiky jsme sledovali v 5 paralelních kulturách. Výsledky jsou shrnuty na obr. 7.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Vliv stáří kultury

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaký vliv má stáří kultury, použité jako inokulum, na vývoj kultury z ní naočkované. Jako kriteria jsme použili délky lag-fáze naočkované kultury. Pro získání srovnatelných hodnot jsme naočkovali současně 60 kultur desulfurikačních bakterií a inkubovali je při 32 °C v termostatu. Ve zvolených časových úsecích jsme přerušili kultivaci vždy u 4 kultur a z nich naočkovali 16 kultivačních lahví s živným roztokem stejného složení, jako byl roztok zvolený pro předkultivaci. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tab. 3.

Diskuse

K pokusům bylo použito kultury desulfurikačních bakterií, isolovaných z naftové vody. Bakterie rodu *Desulfovibrio* byly v této kultuře doprovázeny průvodní mikroflorou, která nebyla dosud určena. Při několikanásobném přeočkování desulfurikačních bakterií z nahromaďovacích kultur jsme získali při zpracování většiny vzorků naftových vod kultury tohoto charakteru. Domníváme se proto, že existuje fysiologický vztah mezi desulfurikačními bakteriemi a průvodní kulturou. Totéž není již možno předpokládat o ostatních bakteriích, které jsme sice zjistili v nahromaďovacích kulturách, avšak v průběhu postupného přeočkovávání vymizely. Protože v přírodních podmínkách (v naftových vodách) musíme počítat rovněž s působením desulfurikačních bakterií ve směsných kulturách, nesnažili jsme se získat pro pokusy čisté kultury rodu *Desulfovibrio*. Pro hodnocení intensity vývoje kultur jsme použili jednak měření produkce sirovodíku (zpravidla po ukončení inkubace), jednak stanovení délky fáze zdržení (lag-fáze). Druhý způsob hodnocení byl sice méně přesný, umožňoval však rychlejší práci a snadnější zvládnutí většího počtu paralelních stanovení. Jak je zřejmé z výsledků provedených pokusů, projevila se mezi oběma způsoby hodnocení dobrá shoda (obr. 5, 6).

Při sledování vlivu výchozího pH živného roztoku na vývoj ložiskových desulfurikačních bakterií jsme zjistili optimum v rozmezí pH 7 až 8 (obr. 5). Tyto výsledky souhlasí s údaji uváděnými v literatuře (Rubenčik 1947, ZoBell 1947). Výchozí oxydoredukční potenciál neovlivňoval pronikavě konečné množství produkovaného sirovodíku, působil však zřetelně na délku lag-fáze kultury. Jako optimální se projevilo prostředí, mající hodnotu E_h v rozmezí od 0 do — 40 mV při pH 7,0 (tab. 1). Výsledky našich pokusů se shodují s literárními údaji v tom, že snížení redoxpotenciálu prostředí usnadňuje start kultury (Grossman a Postgate 1953), naměřené hodnoty však nesouhlasí úplně s údajem ZoBellovým (1947), který zjistil optimální vývoj těchto bakterií při E_h — 50 až — 350 mV při pH 7 až 7,5. Ve shodě s údaji jiných autorů (Stárka 1951) ukazují naše pokusy, že pro dobrý vývoj kultur desulfurikačních bakterií stačí jen malé snížení oxydoredukčního potenciálu prostředí (zhruba pod + 150 mV při pH 7). Přídavek kvasničného extraktu jako zdroje růstových látek se projevil příznivě. Zřetelná stimulace nastávala při koncentracích 3 až 10 mg kvasničného extraktu ve 100 ml živného roztoku (tab. 2). Tento výsledek lze těžko srovnat s literárními údaji (Grossman a Postgate 1953, Imšeneckij 1949, Starkey 1948), poněvadž v těchto pracích není podrobněji popsána příprava použitého kvasničného extraktu.

Vliv koncentrace síranu v živném prostředí na vývoj desulfurikačních bakterií nebyl dosud jinými autory systematicky studován. Zjištění vlivu tohoto faktoru je velmi důležité jak pro určení optimálního složení živného roztoku, tak také pro přesnější hodnocení vyvíjející se kultury podle množství produkovaného sirovodíku. Zásadní důležitost má také pro sledování vývoje desulfurikačních bakterií v prostředí naftových vod, které jsou zpravidla na sírany chudé. Z výsledků našich

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

pokusů vyplývá, že se stoupající koncentrací síranů přibývá celkového množství produkovaného sirovodíku (obr. 6). I velmi nízké koncentrace síranů (0,0001 až 0,001 mol) umožňují sice vývoj desulfurikačních bakterií, avšak růstová křivka kultury v tomto prostředí má poměrně dlouhou fázi zdržení. Síran je v rozmezí těchto koncentrací prakticky kvantitativně zredukován na sirovodík. Od koncentrace 0,003 ml zaujímá již lag-fáze minimální časový úsek (18 hod.) a při zvyšování koncentrací síranu se její doba dále nezkracuje. Se stoupajícími koncentracemi síranu klesá však postupně procento jeho využití. Tento pokles je zvláště zřetelný při koncentracích vyšších než 0,05 mol. Na základě těchto zjištění je možno považovat za optimální živné prostředí obsahující 0,005 až 0,02 mol $Na_2SO_4 . 10 H_2O$ (0,07 až 0,28 % Na_2SO_4 bezvodého). Při použití vyšších koncentrací síranu je možno dosáhnout vyšších výtěžků sirovodíku, lag-fáze se však již nezkracuje a procento využití síranu rychle poklesá.

Výsledky sledování růstových charakteristik vyvíjející se kultury ukázaly, že mezi všemi použitými měřítky (počet bakterií, produkce H_2S, redoxpotenciál) existuje zákonitý vztah (obr. 7). Při zjištění růstových křivek jsou všechny uvedené způsoby vhodné a pro podrobnější hodnocení se vzájemně doplňují. Na křivkách produkce sirovodíku a počtu bakterií je výrazná lag-fáze, trvající zhruba 1 den. Na křivce oxydoredukčního potenciálu prostředí se fáze zdržení neprojevila. Z tohoto výsledku je možno soudit, že v období lag-fáze při množení bakterií dochází k vyregulování oxydoredukčního potenciálu. Na počátku logaritmické fáze množení bakterií a produkce sirovodíku (asi po 18 hodinách kultivace) dosahuje oxydoredukční potenciál zhruba hodnoty E_h — 40 mV při pH 7. Tato hodnota je shodná s optimálními výchozími hodnotami oxydoredukčního potenciálu, zjištěnými v předcházejících pokusech (tab. 1). Logaritmická fáze trvá za daných podmínek zhruba do konce 4. dne kultivace, stacionární fáze asi do 8. dne kultivace. Produkce sirovodíku od 6. dne kultivace prakticky již nepokračuje, takže konečné hodnocení jeho množství v kultuře, jak jsme ho používali při svých pokusech, je možno považovat za vhodné.

V poslední pokusné serii byl hodnocen vliv délky předkultivace na aktivitu inokula. Zjistili jsme, že kultura stará 2 až 3 dni je nejvhodnější jako inokulum. Ze srovnání s růstovou křivkou desulfurikačních bakterií (obr. 7) je zřejmé, že kultura tohoto stáří se nalézá v logaritmické fázi množení. Se stoupajícím stářím kultury se zmenšuje její vhodnost k použití jako inokula, neboť se postupně prodlužuje lag-fáze. Při předkultivaci delší než 10 dní zaujímá logaritmická fáze na očkované kultury již velmi dlouhý časový úsek. Délka lag-fáze velmi kolísá a kultura se tím stává nespolehlivou jako inokulum pro přípravu dalších kultur. Provedené práce byly přípravou pro další, podrobnější studium ložiskových desulfurikačních bakterií. Přinesly základní poznatky o získávání nahromaďovacích kultur desulfurikačních bakterií z ložiskových vod a o jejich další kultivaci za laboratorních podmínek.

Souhrn

Studovali jsme podklady pro laboratorní kultivaci desulfurikačních bakterií, isolovaných z vod naftových ložisek. K pokusům jsme použili směsné kultury, obsahující bakterie rodu *Desulfovibrio* provázené doprovodnou mikroflorou, která nebyla blíže určena. Pro hodnocení vývoje kultur bylo použito měření produkce sirovodíku a délky lag-fáze kultury. Dospěli jsme k těmto výsledkům:

1. Optimální výchozí pH pro kulturu desulfurikačních bakterií je v rozmezí hodnot 7 až 8.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

2. Optimální výchozí oxydoredukční potenciál živného roztoku je v rozmezí E_h 0 až — 40 mV při pH 7. Dobrý vývoj kultury nastává však již při snížení oxydoredukčního potenciálu pod hodnotu E_h + 150 mV při pH 7.

3. Přídavek kvasničného extraktu působil příznivě na vývoj kultury. Stimulace produkce sirovodíku se projevila při dávkách 3 až 10 mg kvasničného extraktu na 100 ml živného roztoku.

4. Koncentrace síranu v živném prostředí ovlivňovala délku lag-fáze i produkci sirovodíku. Při nízkých koncentracích $Na_2SO_4 . 10 H_2O$ (0,0001 až 0,001 mol) byl síran prakticky úplně redukován na sirovodík, avšak lag-fáze kultury byla prodloužena. Optimální koncentrace pro kultivaci leží v rozmezí 0,07 až 0,28 % bezvodého síranu sodného.

5. Při sledování počtu bakterií, produkce sirovodíku a změn oxydoredukčního potenciálu v průběhu kultivace byla zjištěna časová rozpětí jednotlivých fází vývoje. Lag-fáze trvala za optimálních podmínek 24 hodin, logaritmická fáze dalších 48 až 72 hodin, stacionární fáze zhruba do 8. dne kultivace.

6. Optimální doba předkultivace kultury pro další očkování je 48 až 72 hodin. U kultur očkovaných bakteriemi po delší předkultivaci se projevuje značně prodloužená a nepravidelná fáze zdržení.

Provedené práce byly přípravou pro další, podrobnější studium desulfurikačních bakterií z naftových ložisek.

(Obrázkové přílohy V, VI).

Literatura

Bastin, E. S.: *The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters.* Science 63 : 21, 1926.

Bastin, E. S., Greer, F. E.: *Additional data on sulphate-reducing bacteria in soils and waters of Illinois oil fields.* Bull. Amer. Assoc. Petroleum Geol. 14 : 153, 1930.

Ginter, R. L.: *Causative agents of sulphate reduction in oil-well waters.* Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol. 14 : 139, 1930.

Ginzburg-Karagičeva, T. L.: *Mikrobiologičeskoje issledovanije serno-solenych vod Apšerona.* Azerbajdžanskoje neftjanoje chozjajstvo (6—7): 30, 1926.

Ginzburg-Karagičeva, T. L.: *Microflora of oil waters and oil bearing formations and biochemical processes caused by it.* Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol. 17 : 52, 1933.

Grossman, J. P., Postgate, J. R.: *Cultivation of sulfate reducing bacteria.* Nature 171 : 600, 1953.

Hemala M., Marek J., Valčíková Z.: *Použití polarografických metod pro rozbor vod naftových ložisek.* Práce Ústavu pro naftový výzkum, publikace 4—8, str. 111, 1955.

Imšeneckij, A. A.: *Optimal'nyje pitatel'nyje sredy dlja desulfurirujuščich bakterij.* Mikrobiologija 18 : 324, 1949.

Jankowski, G. J., ZoBell, C. E.: *Hydrocarbon production by sulphate reducing bacteria.* J. Bact. 47 : 447, 1944.

Novelli, G. D., ZoBell, C. E.: *Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulphate-reducing bacteria.* J. Bact. 47 : 447, 1944.

Porfirjev, V. B.: *Rol' mikroorganismov v obrazovaniji i metamorfizme nefti.* Trudy Lvovskogo tov. geol., ser. geol. (1), 1948.

Radčenko, O. A.: *Sovremennyje predstavlenija o genezise nefti i procesach jeje pereobrazovanija i razrušenija.* Pamjati akad. I. M. Gubkina. Moskva 1951.

Rubenčik, L. I.: *Sulfatreducirujuščije bakteriji.* Moskva 1947.

Stárka, J.: *Nové poznatky o mikrobiální redukci sulfátů.* Biologické listy 32 : 108, 1951.

Starkey, R. L.: *Characteristics and cultivation of sulphate reducing bacteria.* J. Am. Water Works Assoc. 40 : 1291, 1948.

Tauson, V. I., Alešina, A. I.: *O vosstanovleniji sulfatov bakterijami v prisutstviji uglevodorodov.* Mikrobiologija 1 : 229, 1932.

Uspenskij, V. A., Gorskaja, A. I., Karpova, I. P.: *Genezis algaritov i processy anaerobnovo okislenija neftej.* Izv. AN SSSR, seria geol. (4) : 89, 1947.

ZoBell, C. E.: *Bacterial release of oil from oil-bearing materials.* World Oil 126 : 36, 127 : 35, 1947.

ZoBell, C. E.: *Assimilation of hydrocarbons by microorganisms.* Advances in Enzymology 10 : 443, 1950.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Культивационные характеристики десульфуризирующих бактерий нефтяных месторождений

М. Досталек и М. Спурный

Резюме

Исследовались предпосылки для лабораторной культивации десульфурирующих бактерий, изолированных из вод нефтяных месторождений. Для опытов использовались смешанные культуры, содержавшие бактерии рода Desulfovibrio с сопровождающей, точнее не определенной микрофлорой. Для оценки развития культуры измерялись: выделение сероводорода и продолжительность лаг-фазы культуры. Были получены следующие результаты: оптимальное исходное значение pH культуры десульфурирующих бактерий лежит в пределах pH 7—8. Оптимальный исходный окислительно-восстановительный потенциал питательного раствора находится в пределах значений E_h от 0 до — 40 mV, при pH 7. Однако культура хорошо размножается еще при падении окислительно-восстановительного потенциала ниже E_h + 150 mV, при pH 7. Добавление к среде дрожжевого экстракта оказывало благоприятное влияние на размножение культуры. Стимуляция продукции сероводорода наблюдалась при дозировке 3—10 мг дрожжевого экстракта на 100 мл питательного раствора. Концентрация сульфата в питательном растворе оказывала влияние на продолжительность лаг-фазы и на выделение сероводорода. При низких концентрациях $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ (0,0001—0,001 мол) наступало практически полное восстановление сероводорода из сульфата, но лаг-фаза культуры затягивалась. Оптимальная для культивации концентрация находится в пределах 0,07—0,28% Na_2SO_4. Прослеживая количество бактерий, выделение сероводорода и изменения в течение культивации окислительно-восстановительного потенциала, мы установили наличие колебаний длительности отдельных фаз роста: при оптимальных условиях лаг-фаза длилась сутки, логарифмическая фаза еще 48—72 часа, а стационарная фаза — приблизительно до 8-го дня культивации. Оптимальная длительность предварительного выращивания культуры для следующего посева равна 48—72 часам. У культур, зараженных бактериями, после продолжительной предварительной культивации наблюдаются значительное удлинение и неправильности фазы задержки роста. Поставленные нами опыты являются подготовкой для дальнейших, более подробных исследований десульфурирующих бактерий из нефтяных месторождений.

Characteristics on Culturing of Sulphate Reducing Bacteria from Oil Deposits

M. Dostálek and M. Spurný

Summary

A study was made of the possibilities for culturing desulphurising bacteria isolated from the water in oil deposits, under laboratory conditions. The experiments were carried out with mixed cultures containing bacteria of the Desulfovibrio genus, together with accompaying microflora not identified in detail. The development of the cultures was estimated by measuring the production of hydrogen sulphide and the length of the lag phase of the culture. The following results were obtained: The optimal initial pH for a culture of desulphurising bacteria is within the limits of values 7 to 8. The optimal initial oxidation-reduction potential of the nutrient solution is within the limits for E_h 0 to -40 mV, with a pH of 7. Good development of the culture already occurs, however, on reducing the oxidation-reduction potential to below the value E_h 150 mV, at a pH of 7. The addition of yeast extract had a favourable effect on the development of the culture. Stimulation of the production of hydrogen sulphide was apparent with doses of 3 – 10 mg. yeast extract per 100 ml. nutrient solution. The concentration of sulphate in the nutrient medium affected the length of the lag phase and the production of hydrogen sulphide. With low concentrations of $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ (0.0001 to 0.001 mol) the sulphate was reduced to hydrogen sulphide practically 100 %, but the lag phase of the culture was prolonged. The optimal concentration for culturing is within the limits of 0.07 to 0.28% Na_2SO_4. When studying the number of bacteria, the production of hydrogen sulphide and changes in the oxidation-reduction potential in the course of culturing, the time spread of the individual phases of development was ascertained. Under optimal conditions the lag phase lasts 24 hours, the logarithmic phase a further 48 to 72 hours and the stationary phase approximately up to the eighth day of culturing. The optimal period for pre-culturing of the culture for further inoculation is 48 to 72 hours. In cultures inoculated with bacteria pre-cultured for a longer period, the lag phase is considerably prolonged and irregular. These experiments were made in preparation for a further, more detailed study of desulphurising bacteria from oil deposits.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 1. (1956) — č. 4

Dlouhodobá imunisace. II.

Změny peritoneálního exsudátu, reakce leukocytární a teplotové

JAROSLAV ŠTERZL

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 11. 1. 1956

V předchozí práci jsme ukázali, že každodenní injekce antigenu, dávaná řadu měsíců, vyvolává útlum tvorby protilátek. Tento jev jsme vysvětlovali jako adaptaci na cizorodé podráždění antigenem; výsledkem je snížená tvorba protilátek. Protože si jako hlavní záměr své studie klademe otázku, zda tento stav útlumu je současně spojen s potlačením odolnosti vůči infekci, zaměřili jsme se i na sledování dalších reakcí zúčastněných v obraně organismu: reakce leukocytární, cytologických změn v peritoneálním exsudátu a reakce teplotové.

Materiál v metody

Skupiny zvířat (krys a králíků) jsou stejné, jak bylo uvedeno v předchozí publikaci (Šterzl 1956); je proto i stejné imunisační schema u těchto zvířat. Pro počítání leukocytů byla krev získávána u krys z ocasní veny, u králíků z ucha; jejich počet byl zjišťován baničkovou metodou, jejich rozpočet určen vždy u 100 buněk. Peritoneální exsudáty byly získány punkcí dutiny břišní, poměr jednotlivých druhů buněk stanoven stejně jako u krevních nátěrů. V peritoneálním exsudátu byly buňky tříděny na polymorfonukleáry, typické lymfocyty a makrofágy. Poslední skupina zahrnuje i přechodné formy lymfomonocytární, kde je zvlášť obtížná přesná klasifikace. Teplotová reakce byla sledována rektálním měřením teploměrem. Hodnoty jsou zaznamenávány v absolutních číslech; pro časté kolísání výchozí hodnoty se neosvědčil Beesonův teplotový index (1947a). Manipulace se zvířaty se dála každý den za stejných podmínek, abychom při pokusu o zjištění podmíněné reakce ji měli jako jednu z částí podmíněného podnětu.

Výsledky

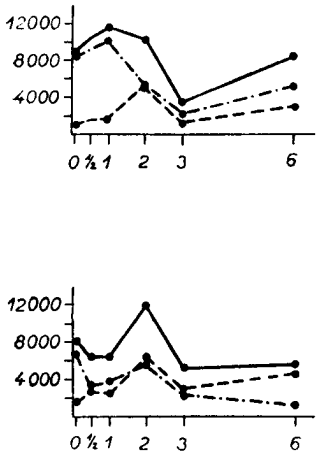
Leukocytární reakce a cytologické změny v peritoneálním exsudátu

U skupiny 20 krys jsme sledovali leukocytární reakci před a 3 hodiny po intraperitoneálním vpichu 1 ml antigenu ($5 . 10^7$ mikrobů). Změny v krevním obraze byly stanoveny v průběhu prvého týdne po začátku imunisace, znovu po jednom a po pěti měsících od počátku každodenní imunisace. Na rozdíl od popisované leukopenické reakce u králíků (na př. Olitzki, Avinery a Beudersky 1941) jsme u krys na užitou dávku antigenu nezjistili pouze leukopenickou reakci, ale u některých zvířat již po první injekci zvyšování počtu leukocytů. Po měsíci každodenní imunisace nenastaly zásadní změny v leukocytární reakci na vpravený antigen. U krys se při každodenní injekci střídají v určitých časových obdobích (průměrně za 3—4 dny) fáze poklesu leukocytů a fáze jejich zvýšení. Tento stav se nezměnil ani po pěti měsících každodenní imunisace.

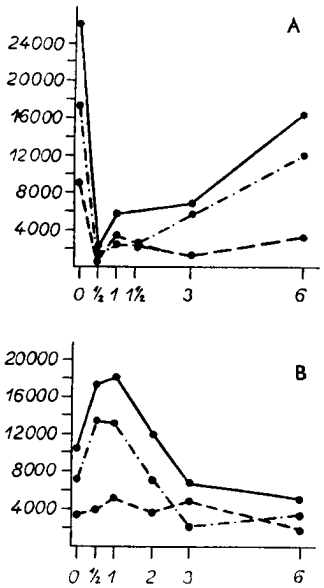
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

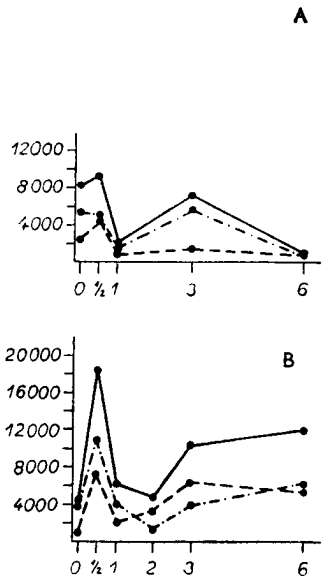
V této době jsme chtěli rozhodnout, zda změny leukocytů jsou vyvolány bezprostředně vpraveným antigenem, nebo zda jsou spojeny podmíněnou reakcí s manipulací a intraperitoneálním injikováním. Výsledek jednoho z pokusů ukazuje změny v krevním obraze po vpichu nepyrogenního fysiologického roztoku



Obr. 1. Normálním krysám injikován intraperitoneálně 1 ml nepyrogenního fysiologického roztoku. Krevní obraz: ——— celkový počet leukocytů, — · — · — lymfocyty, — — — polymorfonukleární leukocyty. Osa x: čas v hodinách, osa y: počet krvinek v tisících.



Obr. 2. A. Změny v krevním obraze po intraperitoneální injekci 1 ml antigenu (5 . 10^7 mikrobů) kryse M, imunisované každodenně 5 měsíců. B. Změny v krevním obraze po intraperit. injekci 1 ml fysiol. roztoku témuž zvířeti.



Obr. 3. A. Změny v krevním obraze po intraperitoneální injekci 1 ml antigenu (5 . 10^7 mikrobů) kryse NZ, každodenně imunisované 5 měsíců. B. Změny v krevním obraze po intraperit. injekci 1 ml fysiol. roztoku témuž zvířeti.

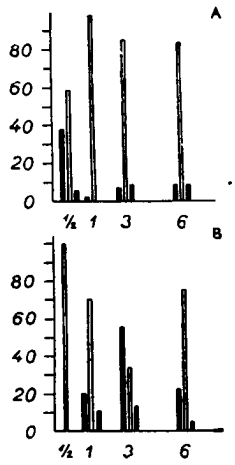
intraperitoneálně normálním krysám (obr. 1). Změny v krevním obraze kolísají v nevelkém rozsahu s maximálními odchylkami ve druhé až třetí hodině po injekci. Intraperitoneální injekce antigenu krysám každodenně imunisovaným pět měsíců vyvolává posun v krevním obraze s maximem po 30 až 60 minutách (obr. 2A, 3A). Týmž zvířatům injikovaný fysiologický roztok způsobí změny v krevním obraze opět nejvýrazněji po 30 až 60 minutách (obr. 2B, 3B). To je jediná společná hodnota, protože jak je z obr. 2 a 3 patrno, nepozorovali jsme při podání antigenu a fysiologického roztoku stejné kvalitativní změny. Vysvětlujeme to tím, že ani při každodenním vpravování nepodmíněného podnětu (antigenu) se nevytváří stálá a typická kvalitativní změna, ale že nastává střídání fáze poklesu a stoupnutí leukocytů.

U stejné skupiny krys jsme sledovali změny cytologické reakce v peritoneálním exsudátu po každodenním vpravení antigenu. Z obrázku 4 je zřejmé, že injekce 1 ml fysiologického roztoku normálním krysám vede převážně k makrofágové reakci. Po intraperitoneální injekci antigenu každodenně imunisovaným krysám následuje výrazná polymorfonukleární reakce (tab. 5A, 6A). Je-li těmto každodenně imunisovaným krysám místo antigenu injikován intraperitoneálně fysiologický

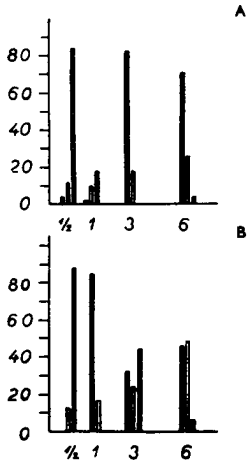
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

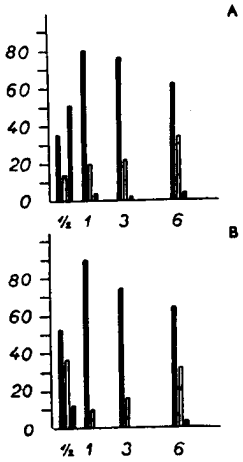
roztok, potom se ve stejném časovém sledu vytvoří polymorfonukleární exsudát (tab. 5B, 6B). Vzhledem ke stejnému časovému i kvalitativnímu charakteru cytologických změn peritoneálního exsudátu po injekci fysiologického roztoku se domníváme, že tyto lze posuzovat jako podmíněnou reakci na každodenní intraperitoneální vpravování antigenu. Je pravděpodobné — výsledky předložíme v dalším sdělení — že vytvoření podmíněné polymorfonukleární reakce se uplatní při intraperitoneálním vpravení infekční dávky.



Obr. 4. A, B: Normálním krysám intraperitoneálně injikován 1 ml fysiol. roztoku. Cytologický obraz peritoneálního exsudátu: prázdný sloupeček - makrofágy, plný - polymorfonukleáry, vodorovně šrafovaný - lymfocyty. Osa x: čas v hodinách. Osa y: procenta jednotlivých buněk v exsudátu.



Obr. 5. A. Změny v peritoneálním exsudátu po intraperitoneální injekci 1 ml antigenu kryse V, imunisované každodenně 5 měsíců. B. Změny v peritoneálním exsudátu po injekci 1 ml fysiol. roztoku i. p. témuž zvířeti.

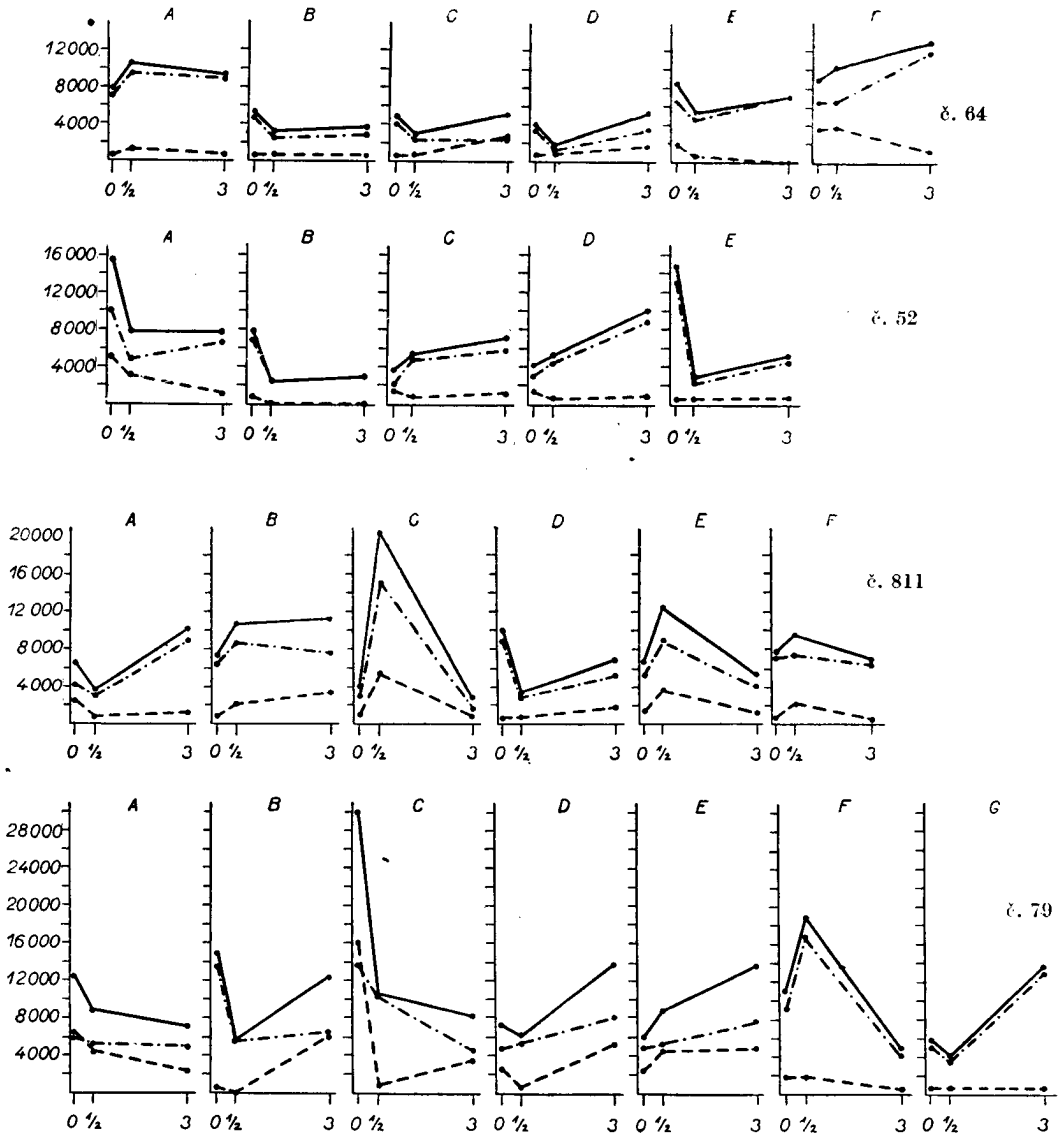


Obr. 6. A. Změny v peritoneálním exsudátu po i. p. injekci 1 ml antigenu kryse M, imunisované každodenně 5 měsíců. B. Témuž zvířeti injikován i. p. 1 ml fysiologického roztoku.

Změny v krevním obraze jsme sledovali i v průběhu několikaměsíční každodenní imunisace králíků (intravenosní dávkou 1 ml 2 . 10^9 mikrobů). Na obrázku 7 jsou zaznamenány leukocytární reakce jednotlivých králíků v různých obdobích v průběhu pětiměsíční imunisace. Z těchto záznamů je možno uzavřít, stejně jako u skupiny krys, že každodenní dlouhodobé vpravování antigenu neutlumilo leukocytární reakci na podávaný antigen. Stejně z našich výsledků plyne i to, že se nevytvořila standardní odpověď na každodenní antigenní podnět stálý jak kvalitou, tak i kvantitou: i v těchto pokusech se mění v určitých časových obdobích fáze leukocytární v leukopenickou a naopak. Z tohoto důvodu zůstalo sledování, zda se vytvořila podmíněná leukocytární reakce, bezvýsledným. Imunisovaným králíkům č. 58, 280, 811, 54, 79, a normálním králíkům č. 91, 827, 4 jsme místo antigenu injikovali fysiologický roztok. Změny krevního obrazu, které vyvolává fysiologický roztok u každodenně imunisovaných zvířat, nejsou zásadně rozdílné od změn u normálních králíků. Není možno ani najít vztah u každodenně imunisovaných zvířat mezi reakcí na antigen a reakcí po vpravení fysiologického roztoku.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1



Obr. 7. Změny krevního obrazu u králíků č. 64, 52, 811, 79 po intravenosní injekci antigenu. Osa x: odběry krve před injekcí, ½ a 3 hodiny po imunisaci. Změny v krevním obraze při každodenní imunisaci jsou zaznamenány v těchto časových odstupech (určeno daty). A: 3. XII. B: 9. XII. C: 16. XII. D: 30. XII. E: 13. I. F: 18. II. a G: 13. IV.

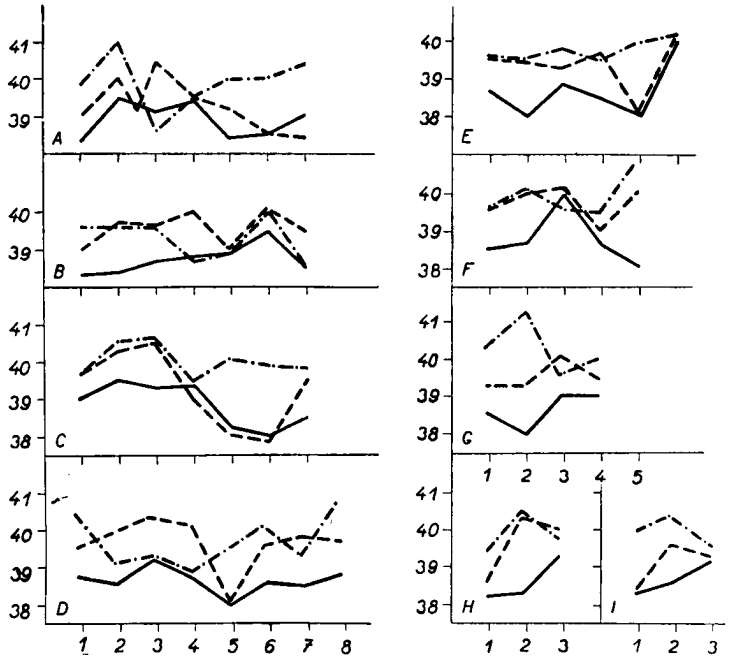
Změny teplotové reakce v průběhu každodenní imunisace

Již prvá zjištění u králíků č. 706, 707, 708 ukázala, že ani po pětiměsíční každodenní imunisaci nemizí teplotová odpověď po injekcích antigenu. Tyto předběžné údaje jsme podrobili rozboru u větší skupiny zvířat. Z obrázků teplotových záznamů králíků č. 58, 64, 79, 82, 280, 8, 811, 4, 54 a 52 je zřejmé, že v průběhu dlouhodobé

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

imunisace se nepodařilo snížit teplotovou reakci. V průběhu imunisačního období jsou náznaky útlumu a opětného zintensivňování teplotové reakce. Celková tendence však, jak ukazujeme liniemi spojujícími teplotu před vpichem antigenu, ½ hodiny a 3 hodiny po injekci antigenu nejeví žádný zásadní směr buď k zesilování nebo útlumu reakce (obr. 8).



Obr. 8. Záznamy změn teploty v průběhu každodenní imunisace. ———————— hodnoty naměřené před imunisací, — — — — — hodnoty ½ hodiny po imunisaci, —·—·— 3 hodiny po imunisaci. Měření teploty zaznamenáno v těchto časových odstupech (určeno daty). 1 = 3. XII., 2 = 9. XII., 3 = 16. XII., 4 = 30. XII., 5 = 13. I., 6 = 27. I., 7 = 18. II., 8 = 13. IV. Záznamy teplot provedeny u králíků A č. 811, B č. 64, C č. 280, D č. 79, E č. 52, F č. 58, G č. 82, H č. 8, I č. 4.

I u této skupiny jsme se pokusili zjistit, zda trvající teplotová reakce není snad výsledkem podmíněného spojení, aniž se přímo účastní antigen svým pyrogenním charakterem. Podmíněná reakce byla opět zjišťována injekcí nepyrogenního fysiologického roztoku za týchž podmínek, jako byl každodenně injikován antigen. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1. Souhrnně tento pokus ukázal, že i když není možno vyloučit u jednotlivých zvířat spoluúčast podmíněné reakce, je pro intensitu teplotové reakce po podání antigenu rozhodující jeho vlastní pyrogenní charakter.

V této souvislosti jsme sledovali, zda teplotová reakce bude kvalitativně i intensitou rozdílná u dlouho imunisovaných králíků ve srovnání s normálními králíky při infekčním procesu. Infekce byla vyvolána intrakardiální injekcí 2 ml *S. paratyphi* B (4 . 10^9 mikrobů). Ukázalo se, že proti imunisační dávce, která způsobovala u všech zvířat zvyšování teploty, infikující dávka vedla ke snížení teploty jak u zvířat kontrolních (obr. 9), tak u zvířat dlouho imunisovaných (obr. 10). V intensitě poklesu teploty nejsou statisticky zjistitelné rozdíly (Dr Zítek, Matematický ústav ČSAV). Přesvědčili jsme se, že toto snížení teploty je způsobeno velkou dávkou endotoxických látek; u normálních zvířat, kterým byly injikovány

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

2 ml teplem usmrcené suspense *S. paratyphi* B, došlo rovněž k poklesu teploty (obr. 11). Tím prokazujeme, že rozdíl zvýšení teploty po imunisační dávce proti poklesu teploty při infekci není podmíněn kvalitou, ale intensitou endotoxického působení.

Tabulka 1.

Pokus o zjištění podmíněné reakce u každodenně imunisovaných králíků. Změny teploty po vpravení 1 ml antigenu ($2 . 10^9$ mikrobů) i. v. 5 měsíců po počátku imunisace králíkům čís. 706, 707, 708 ($5 . 10^7$ mikrobů)

Králík číslo	Před	Po imunisaci	
		½ hod.	3 hod.
58	38,0	40,1	40,8
280	38,5	39,5	39,8
811	39,0	38,4	40,4
54	38,7	39,5	40,6
79	38,8	39,7	40,8
	i. v.		
	před	½ hod.	3 hod.
706	38,5	40,2	39,0
707	38,0	39,8	38,0
708	37,8	39,4	38,7

Týmž králíkům (každodenně imunisovaným) vstřiknut 1 ml fysiologického roztoku i. v.

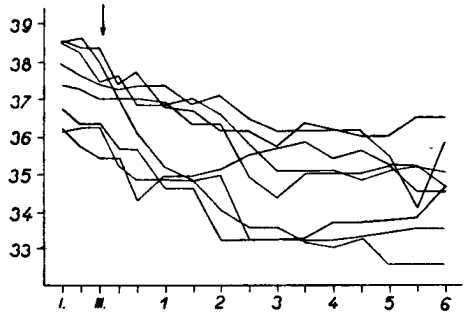
Králík číslo	Před	Po injekci i. v.		Reakce
		½ hod.	3 hod.	
58	38,5	38,8	39,9	+
280	38,8	38,8	39,9	0
811	38,2	38,0	39,8	+
54	38,5	38,4	38,9	±
79	38,8	38,6	38,9	0
706	39,3	40,2	39,3	+
707	38,7	39,7	39,2	+
708	39,3	39,7	39,4	±

Normálním neimunisovaným králíkům vstřiknut fysiologický roztok i. v.

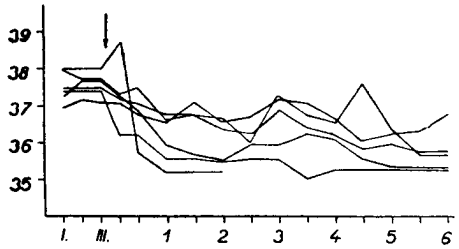
Králík číslo	Před	Po injekci		Reakce
		½ hod.	3 hod.	
91	38,6	38,5	38,5	0
827	38,3	38,5	38,5	0
4	38,3	38,8	38,7	±
0	39,2	39,8	39,7	±
1	39,3	39,2	39,3	0
2	39,7	39,7	39,5	0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

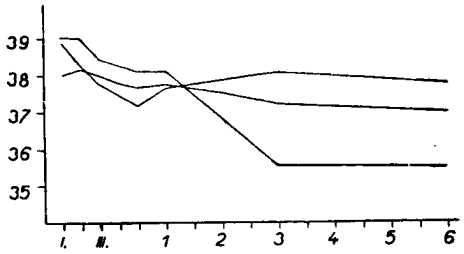
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1



Obr. 9. Teploty u normálních neimunisovaných králíků č. 60, 61, 62, 92, 698, 845, 237, 334, kterým injikovány intrakardiálně 2 ml suspense živých mikrobů *S. paratyphi* B (4 . 10^9 mikrobů). Osa *x*: I—III záznam před vpravením infekční dávky, po injekci (šipka) čas v hodinách. Osa *y*: teplota ve stupních C.



Obr. 10. Teploty každodenně opakovaně imunisovaných králíků (od 27. V.—29. VIII.) 1 ml antigenu *S. paratyphi* B (2 . 10^9 mikrobů) čís. 680, 640, 605, 610, 606, 834 po intrakardiální injekci infekční dávky 4 . 10^9 mikrobů. Vysvětlivky ke grafu u obr. 10.



Obr. 11. Záznamy teplot normálních králíků č. 197, 221, 138, kterým intrakardiálně injikovány 2 ml teplem inaktivované suspense *S. paratyphi* B. (4 . 10^9 mikrobů). Vysvětlivky ke grafu u obr. 10.

Diskuse

Naše výsledky ukazují, že u týchž zvířat, u kterých jsme zjistili po dlouhodobé každodenní imunisaci útlum tvorby protilátek (Šterzl 1956), jsme podobný jev útlumu nezaznamenali u obecných imunitních reakcí, jako je reakce leukocytární, cytologické změny v peritoneálním exsudátu a změny teploty. Tato zjištění jsou závažná pro posouzení podstaty, t. zv. „adaptace", jíž jsme vysvětlovali snížení tvorby protilátek při opakované imunisaci. Pro zhodnocení těchto nálezů je třeba přehlédnout i práce jiných autorů.

Často se uvádí, že opakované vpravení antigenu má za následek snížení teplotové reakce. Wright (1930) zjistil, že opakované injekce v průběhu dvou měsíců vedou k tomu, že již nelze zaznamenat stoupnutí teploty v rozmezí 1—5 hodin. Autor prokazoval, že jde o jev specifický tak, že vpravil v době útlumu teplotové reakce jiného mikroba a dostal horečnatou odpověď. Rovněž Beeson (1947a) zjistil celkové snížení teploty při opakované imunisaci bakterijními pyrogeny, a to již během týdne nebo 10 dní; po této době zvíře odpovídalo na další injekce vždy stejným stupněm horečky po řadu týdnů. Snížení teplotové reakce nemělo vztah ani k leukocytární reakci, ani k vytvářeným protilátkám. V další práci (Beeson 1947b) ukázal na to, že tolerance k bakterijním pyrogenům je závislá na funkčním stavu mesenchymální tkáně, t. j. intensitě vychytávání pyrogenů z krve. Podařilo se mu snížení teplotové reakce — toleranci vůči bakterijním pyrogenům — eliminovat thorotrastem a trypanovou modří. Ukázal, že vznik tolerance není specifický jen vůči určitému mikrobnímu druhu. Jeho práce, především o druhové nespecifičnosti získané tolerance vůči bakterijním pyrogenům, potvrdil Bennett

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

(1948). Oba autoři (Bennett a Beeson 1953a, b) dále sledovali, zda se z tkání neuvolňují pyrogenní látky pod vlivem antigenů. Jediné buňky, jejichž extrakty zvyšovaly teplotu, byly polymorfonukleární leukocyty. Bylo zjištěno, že látka z polymorfonukleárů je sice termolabilní, ale není enzymaticky rozrušována. Tím se spojil směr studující teplotovou reakci se známým zjištěním, že pod vlivem pyrogenních látek dochází k leukopenii. V tomto směru jsou závažné výsledky Berthronga a Cluffa (1953), kteří pozorovali, že lze zjistit po opakovaném vpravení pyrogenních látek získanou resistenci i u individuálních buněk, leukocytů. Vpravení endotoxinů do organismu utlumuje migraci polymorfonukleárů. Opakovaná každodenní injekce endotoxinu dává vznik resistenci, trvající 10 až 15 dní. Tato práce je závažná i v tom směru, že endotoxin utlumoval leukocyty v migraci jen tehdy, byl-li vpraven in vivo. Jeho přidání k buňkám in vitro v mnohem větším množství, než byla dávka in vivo, migraci nebrání. Dubos (1954) z těchto výsledků uzavírá, že endotoxin ovlivňuje regulující složky v živém organismu, pravděpodobně nervový systém.

Jiným směrem jdou práce, které prokazují, že pyrogenní reakce je výsledkem působení bakterijního pyrogenu na určité složky sera (LeQuire 1951, Farr, Clark a j. 1954, Grant 1953).

Tyto rozpory částečně řeší práce Atkinsovy. V prvé práci (1955a) spojuje vznik útlumu horečnaté reakce s tím, že po opakovaném vpravení antigenu nedochází k leukopenii. Podle něho to svědčí pro domněnku, že horečka je vyvolávána produkty rozpadlých leukocytů. Víme však, že ani v uvedených pracích (na př. Beeson 1947a), ani v pracích pozdějších nebyla spojitost mezi pyrogenní reakcí a leukopenií potvrzena. Na př. Bennett (Bennett a Cluff 1952) vyvolal pomocí NH_2 dlouhodobou leukopenii; pyrogenní reakce na endotoxiny se v této době nijak nezměnila. Rozpor mezi pracemi sledujícími vliv pyrogenů na serum nebo buňky vysvětlil Atkins v druhé práci (1955b). Ukázal, že je-li zvířeti odebráno serum krátce po vpravení endotoxinu, dostal se endotoxin do vazby se serem a vytvořil t. zv. „exogenní pyrogen". To je obdoba pyrogenních látek, vznikajících po smíchání pyrogenu a sera in vitro. Je-li serum s tímto pyrogenem injikováno normálnímu králíkovi, vyvolá horečnatou reakci; naopak u zvířete, u kterého byla vytvořena opakovaným dávkováním „tolerance" vůči pyrogenu, teplotová reakce nenastane. Naopak po delší době působení pyrogenní látky (endotoxinu) v organismu, uvolňují se z tkání zvířete látky („endogenní pyrogen"), které vyvolají přenosem na normální i tolerantní zvíře horečnatou reakci.

Všechny tyto práce sledují periferní změny pod vlivem endotoxinu. Není v literatuře dnes rozporu o tom, že hlavní regulační centra teplotové reakce jsou subtalamická nervová centra (Leschke 1913, Rašková 1954, Siedek 1955, Thauer 1955). Jakým významným způsobem jsou však závislá na periferním působení endotoxinu, svědčí pokus Grantův (1955). Ten vpravil pyrogen přímo do hypothalamu a zjistil, že reakce je slabší a protrahovaná proti tomu, když injikoval stejné množství intravenosně. Usuzuje z toho, že není přímé působení pyrogenu na mozková centra, ale že nutně předcházelo vstřebání a teprve podněty z organismu, že jsou podnětem horečnaté reakce.

Bude jistě velmi významné v tomto směru sledovat vliv endotoxinu na krevní obraz. Pro řízení krevního obrazu je velmi mnoho známo o nervově regulačních mechanismech, ovládaných opět z hypothalamu (Hoff 1932, Černigovskij a Jaroševskij 1953, atd); mnohem méně však, jak působí endotoxin přímo na buňky na periferii a jak se převádí podnět z periferie k subthalamickým centrům.

Srovnáme-li vlastní výsledky s uvedenými pracemi, pokládáme za nejpodstatnější, že ani po šestiměsíčním každodenním vpravování velkých dávek antigenu se nepodařilo dosáhnout útlum reakce leukocytární a teplotové. Hlavní důvod vidíme v tom, že organismus na vpravení velkých dávek cizorodých látek, které hluboce porušují rovnováhu řady fysiologických reakcí, se nemůže adaptovat prostou nevnímavostí vůči těmto podnětům, bez reakce. Naopak při tak intensivním podráždění je právě reakce podstatou vyrovnávání, normalisace funkčního stavu organismu. Tím si také vysvětlujeme, že dochází k fázovým změnám (střídání fáze leukocytární a leukopenické) při každodenní injekci velké dávky antigenu. Podobnou normalisaci fysiologického stavu pomocí fázových změn jsme popsali i při vpravování velkých dávek antileukocytárního sera (Šterzl 1954).

Naše výsledky ukazují i nesprávnost předpokládaných souvislostí mezi leukopenií a teplotovou reakcí. Z obr. 7 a 8 vyplývá, že pokles leukocytů není v přímém vztahu k horečnaté reakci; i při leukocytární reakci zůstává zachované stoupnutí teploty po vpravení antigenu.

Hlavní výsledek tohoto sdělení vidíme v tom, že jsme nezjistili závislost mezi útlumem tvorby protilátek při každodenní imunisaci a dalšími fysiologickými reakcemi; současně se nesnižuje reakce teplotová ani leukocytární. Z těchto pozorování je možno uzavřít, že tvorba protilátek nedává dostatečný obraz o celkovém reakčním stavu organismu: snížení tvorby protilátek neznamená všeobecný útlum mecha-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

nismů, zúčastněných v obraně organismu. Nelze proto podle tohoto jednoho indikátoru (tvorby protilátek) posuzovat stav organismu jako „imunologický útlum" (Zdrodovskij 1954). Naopak z výsledků plyne, že ne všechny obranné mechanismy jsou ve svých konkretních funkčních projevech závislé vždy na společné reaktivitě organismu. Výsledky naznačují, že snížení protilátek při dlouhodobé imunisaci je podmíněno změnou funkce specifického mechanismu tvorby protilátek.

Tyto výsledky potom ukazují, jak významné je sledovat nespecifické indikátory pro zjišťování podstaty i u jiných skupin „imunologických útlumů". Zvláště důležité to bude tam, kde k potlačení tvorby protilátek dochází působením antigenu na organismus ve stavu, kdy tento nereaguje tvorbou protilátek buď přirozeně (v raných obdobích ontogenesy — Hašek a Hraba 1953, 1955, Billingham, Brent a Medawar 1953, Buxton 1954, Hanan a Oyama 1954, Kerr a Robertson 1954, Simonsen 1955, Dixon a Maurer 1955, Cinader a Dubert 1955) nebo po umělém zásahu (na př. po ozáření X-paprsky — Dixon a Maurer 1955). Naše práce ukazuje, že sledováním širšího rejstříku fysiologických změn po injekci antigenu bude možno rozhodnout, zda útlum tvorby protilátek i v těchto případech znamená isolovanou změnu mechanismů tvorby protilátek nebo obecné snížení reakce cizorodosti vůči specifickým antigenům.

Souhrn

U zvířat, u kterých se po každodenní půlroční imunisaci utlumila tvorba protilátek, byla sledována po imunisační dávce intensita změn leukocytů v periferní krvi, v peritoneálním exsudátu a intensita teplotové reakce.

Pokusy ukázaly, že tyto odpovědi jsou po vpravení antigenu — v době útlumu tvorby protilátek — plně zachovány.

Nezjistili jsme — s výjimkou reakce v peritoneálním exsudátu — že by zachované odpovědi byly výsledkem vytvořeného podmíněného spojení; jsou působeny přímým dráždivým vlivem antigenu.

Uzavíráme proto, že snížení tvorby protilátek po každodenní dlouhodobé imunisaci není možno posuzovat jako snížení obecné reaktivnosti organismu, jako „imunologický útlum", ale že podstatou jsou změny ve specifických pochodech tvorby protilátek.

Za technickou spolupráci děkuji L. Třískové a D. Žaloudkové.

Literatura

Atkins, E., Wood, W. B.: *Studies on the pathogenesis of fever. I. The presence of transferable pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine.* J. Exp. Med. 101 : 519, 1955a.

Atkins, E., Barry, Wood W.: *Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine.* J. Exp. Med. 102 : 499, 1955b.

Beeson, P. B.: *Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development.* J. Exp. Med. 86 : 29, 1947a.

Beeson, P. B.: *Tolerance to bacterial pyrogens. II. Role of the reticulo-endothelial system.* J. Exp. Med. 86 : 39, 1947b.

Bennett, I. L.: *Observations on the fever caused by bacterial pyrogens. I. A study of the relationship between the fever caused by bacterial pyrogens and the fever accompanying acute infection.* J. Exp. Med. 88 : 267, 1948.

Bennett, I. L., Beeson, P. B.: *Studies on the pathogenesis of fever. I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits.* J. Exp. Med. 98 : 477, 1953a.

Bennett, I. L., Beeson, P. B.: *Studies on the pathogenesis of fever. II. Characterisation of fever producing substances from polymorphonuclear leucocytes and from the fluid of sterile exsudates.* J. Exp. Med. 98 : 493, 1953b.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Bennett, I. L., Cluff, L. E.: *Influence of nitrogen mustard upon reactions to bacterial endotoxine: Schwarzman phenomen and fever.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81 : 304, 1952.

Berthrong, M., Cluff, L. E.: *Studies of the effect of bacterial endotoxins on rabbit leucocytes. I. Effect of intravenous injection of the substances with and without induction of the local Schwarzman reaction.* J. Exp. Med. 98 : 331, 1953.

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: *Actively acquired tolerance of foreign cells.* Nature 172 : 603, 1953.

Buxton, A.: *Antibody production in avian embryos and young chicks.* J. Gen. Microb. 10 : 398, 1954.

Cinader, B., Dubert, J. M.: *Acquired immune tolerance to human albumin and the response to subsequent injections of diazo human albumin.* Brit. J. Exp. Path. 36 : 515, 1955.

Cluff, L. E.: *Studies of the effect on bacterial endotoxins on rabbit leucocytes. II. Development of acquired resistance.* J. Exp. Med. 98 : 349, 1953.

Černigovskij, V. N., Jaroševskij, A. J.: *Voprosy nervnoj reguljaciji sistemy krovi.* Moskva 1953.

Dixon, F. J., Maurer, P. H.: *Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens.* J. Exp. Med. 101 : 245 1955.

Dubos, R. J.: *Biochemical determinants of microbial diseases.* Cambridge 1954.

Farr, R. S., Clark, S. L., Proffit, J. E., Campbell, D. H.: *Some humoral aspects on the development of tolerance to bacterial pyrogens in rabbits.* Am. J. Physiol. 177 : 269, 1954.

Grant, R.: *Evidence that changes in blood plasma are responsible for developed refractoriness to bacterial pyrogens.* Fed. Proc. 12 : 55, 1953.

Grant, R., Lewis, J., Ahrne, I.: *Effect of intrahypothalamic injections of pyrogens.* Fed. Proc. 14 : 61, 1955.

Grant, R., Whalen, W. J.: *Latency of pyrogen fever; appearance of a fast acting pyrogen in the blood of febrile animals and in plasma incubated with bacterial pyrogen.* Am. J. Physiol. 173 : 47, 1953.

Hanan, R., Oyama, J.: *Inhibition of antibody formation in mature rabbits by contact with the antigen at an early age.* J. Immunol. 73 : 49, 1954.

Hašek, M., Hraba, T.: *Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji.* Čs. biologie 2 : 265, 1953.

Hašek, M., Hraba, T.: *Immunological effects of experimental embryonal parabiosis.* Nature 175 : 764, 1955.

Hoff, F.: *Klinische Beiträge zur Frage der zentralnervösen Regulation des Blutes.* Klin. Wochenschr. 11 (II) : 1751, 1932.

Kerr, W. R., Robertson, M.: *Passively and actively acquired antibodies for Trichomonas foetus in very young calves.* J. Hygiene 52 : 253, 1954.

Le Quire, V. S.: *The augmentation of the thermogenic effects of pyrogens by homologous plasma in rabbits.* J. Infect. Dis. 88 : 194, 1951.

Leschke, E.: *Über den Einfluss des Zwischenhirns auf die Wärmeregulation.* Zschr. ex. Pathol. Therap. 14 : 167, 1913.

Olitzki, L., Avinery, S., Beudersky, J.: *The leucopenic action of different microorganisms and the anti-leucopenic immunity.* J. Immunol., 41 : 361, 1941.

Rašková, H., Šteklová, B.: *Příspěvek ke vzniku podmíněných horečnatých reakcí.* Čas. lék. čes. 93 : 569, 1954.

Siedek, A.: *Über die zeitlichen Verhältnisse der phasenförmigen Reizbeantwortung an Pyrogeninjection.* Acta neuroveg. 11 : 94, 1955.

Simonsen, M.: *Induced tolerance to heterologous cells and induced susceptibility to virus.* Nature, 175 : 763, 1955.

Šterzl, J.: *Obranné pochody v organismu. Mesenchymální tkáň při infekci a imunisaci.* Praha 1954.

Šterzl, J.: *Dlouhodobá imunisace. I. Útlum tvorby protilátek při každodenní imunisaci.* Čs. mikrobiol. 1 : 7, 1956.

Thauer, R.: *Physiologie der Wärmeregulation.* Acta neuroveg. 11 : 12, 1955.

Wright, H. D.: *The effect of immunisation upon temperature response in rabbits.* J. Path. Bact. 33 : 925, 1930.

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

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Длительная иммунизация. II.

Изменения в перитонеальном экссудате, лейкоцитарной и температурной реакции

Я. Штерцль

Резюме

У животных, у которых в результате полугодовой ежедневной иммунизации была подавлена способность к образованию антител, исследовались (после введения иммунизирующей дозы) интенсивность изменений количества лейкоцитов в периферической крови и в перитонеальном экссудате и интенсивность температурной реакции. Опыты показали, что эти реакции на введение антигена полностью сохраняются и в период угнетения образования антител. Мы не находили, что эти реакции сохранялись бы в результате выработавшейся временной условной связи, — за исключением реакции в перитонеальном экссудате: напротив, они вызываются непосредственно раздражающим действием антигена. Поэтому мы делаем вывод, что снижение способности к образованию антител в результате длительной ежедневной иммунизации не следует рассматривать как снижение общей реактивности организма, каким является «иммунологическое торможение», ибо сущность изменений заключается в специфических процессах образования антител.

Long-term Immunisation. II.

Changes in the Peritoneal Exudate, Leucocytic and Temperature Reactions

J. Šterzl

Summary

The intensity of leucocytic changes in the peripheral blood, in the peritoneal exudate and the intensity of temperature reactions following an immunisation dose was studied in animals in which, after daily immunisation for half a year, the formation of antibodies had been depressed. The experiments showed that, after administration of the antigen—in the period of depression of antibody formation—these responses are fully preserved. It was not found (with the exception of the reaction in the peritoneal exudate) that the preserved responses were the result of the formation of a conditioned association; they are caused by the direct irritant action of the antigen. It is therefore concluded that the decrease in the formation of antibodies following prolonged, daily immunisation cannot be evaluated as a decrease in the general reactivity of the organism, like "immunological depression", but that it is based on changes in specific processes of antibody formation.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 4

Poznámky k čištění odpadních vod mlékárenských pomocí *Oospora lactis*

MILOSLAV SVOBODA a JAROMÍR ŠALPLACHTA

Výzkumný ústav pro mléko a vejce, Brno

Došlo 6. 4. 1955

Čištění odpadních vod průmyslu potravinářského je závažným problémem. U nás se touto otázkou zabýval zejména Jonáš (1950, 1951, 1952).

Princip jeho způsobu čištění odpadních vod spočívá v prokvašení uhlohydrátů a jiných zkvasitelných látek vhodnými druhy plísňovitých mikroorganismů *(Oospora lactis)*, které převádějí tyto látky v buněčnou bílkovinu a vytvářejí dlouhá spletitá mycelia. K prokvašeným vodám se přidává vápenné mléko do pH 9—10. Kombinací dlouhomycelnatých plísní s vápenatými solemi vzniká hustý kalový mrak, který rychle ssedá ke dnu nádoby a strhuje s sebou prakticky veškeré pevné suspensoidy, čímž se kapalina vyčeří. Vyčeřená odpadní voda se z hlavní kádě vypouští do akumulační nádrže, kde se mísí s potoční vodou, při čemž se její alkalita má snížit pod pH 8. Teprve pak se vypouští do veřejného recipientu. Usazený kal se filtruje přes kalolisy a získává se v podobě pevné hmoty.

Již při patentování tohoto způsobu čištění odpadních vod (Jonáš 1951) bylo upozorněno na možnosti jeho použití pro různé odpadní vody potravinářského průmyslu. Podle sdělení autorova (Jonáš 1950, 1952) bylo použito této metody s velmi dobrými výsledky v poloprovozním až provozním měřítku při čištění odpadních vod mlékárenských, drožďářských a na butanolových výpalcích. Na základě provozních pokusů s čištěním odpadních vod mlékárenských Jonáš (1952) pak konstatuje: „Čištění je v přímé souvislosti hlavně s obsahem laktosy. Je to otázka nejen kvantitativní (množství štěpitelné laktosy), ale i otázka kvalitativních změn (ostatní organické látky štěpí se současně a lépe za přítomnosti laktosy). Zkyslá syrovátka se čistí s menším efektem. Desinfekční prostředky snižují čisticí efekt, nikoliv však zvlášť podstatně. Štěpení laktosy v plnoprovozních pokusech je nižší než bylo možno podle laboratorních pokusů dosáhnout. Snížení dusíkatých látek je pozoruhodně vysoké."

V roce 1954 jsme se účastnili prověřování Jonášovy metody v praxi (Marek, Svoboda a spol. 1954). Značné kolísání čisticích účinků odpadních vod mlékárenských při použití této metody nás mělo k tomu, že jsme si podrobněji všímali činitelů, podílejících se na dosahovaných výsledcích čistírny. Všímali jsme si předně mikroorganismu, kterému Jonáš (1950, 1951, 1952) přisuzuje schopnost zkvasit laktosu obsaženou v odpadních mlékárenských vodách. Četní autoři došli totiž k závěru, že pro *Oospora lactis* je laktosa špatným zdrojem výživy (Jörgensen 1909, Janke 1924, Teichert 1902, Lembke a Delitsch 1943). Zdá se tedy, že pod názvem *Oospora lactis* jsou zahrnuty různé druhy a variety, což konstatoval již Jörgensen (1909). Poněvadž údaje v literatuře nebyly mnohdy zcela jasně formulovány, rozhodli jsme se prozkoumat fysiologické vlastnosti kmene *Oospora lactis* použitého k čištění mlékárenských odpadních vod.

Materiál a metody

Mikroorganismus a kultivační metodika. K pokusům jsme používali kultury *O. lactis* na šikmém sladinkovém agaru. Při závěrečných pokusech jsme použili přečištěné kultury (rozsev na desky a odpich z ojedinělé kolonie).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Pro inokulaci jednotlivých pokusů jsme převedli kulturu s šikmého sladinkového agaru na melasovou sladinku frakciovaně sterilovanou, 4—6 Bg° o pH 6 s 1 % síranu amonného a 0,1 % středního fosforečnanu amonného nebo 0,2 % fosforečnanu sodného v Erlenmeyerových baňkách o obsahu 300 až 1000 ml. Po 6—7denní stacionární kultivaci jsme odlili živný substrát, myceliální přikrývku rozmělnili a vzniklou kaší naočkovali substrát ve větraných baňkách. Pokusy jsme konali při 27 až 30 °C nebo při teplotě laboratoře. Jako kultivačních nádob jsme používali varných nebo Erlenmeyerových baněk obsahu 1, 5 nebo 10 litrů. Pro pokusy se stacionární kultivací jsme použili Fernbachovy baňky o průměru dna 16 cm. Množství substrátu se pohybovalo od 0,25 do 4 litrů.

K větrání jsme používali proudu sterilního vzduchu z laboratorní tlakové vývěvy. Čistý substrát a průběh kvašení jsme kontrolovali na mikrobiologickou čistotu plotnovou metodou (Vintika 1951). K srážení pěny jsme používali odpěňovacího tuku.

Schopnost *O. lactis* odbourávat přímo laktosu jsme zkoušeli na syrovátce nezředěné a zředěné, sterilisované v autoklávu, pasteurisované při 80 °C a syrové, případně ještě naočkované smetanovým zákysem. Dále jsme konali pokusy i na syntetickém substrátu podle Niklase a na odpadní mlékárenské vodě.

Substrát podle Niklase má toto složení: kyselina citronová 1,0 %; $(NH_4)_2SO_4$ 0,6 %; pepton 0,1 %; $(NH_4)_2HPO_4$ 0,075 %; K_2SO_4 0,02 %; $MgSO_4$ 0,03 %; $CuSO_4$ 0,00015 %; $ZnSO_4$ 0,0001 %; $FeSO_4$ 0,0001 %.

Analytické metody. Titrační kyselost jsme měřili spotřebou 0,10 až 0,25 N NaOH na 10—100 ml substrátu. pH jsme zjišťovali na pH-metru se skleněnou elektrodou. Laktosu jsme stanovili podle Gohra (Laxa 1944). Rozpustné bílkoviny jsme stanovili ve filtrátu substrátu.

Výsledky

Tab. 1. Kultivace *O. lactis* na sterilní syrovátce o různé kyselosti. Teplota laboratorní (18—23°C). Očkováno přímo celou kulturou *O. lactis* na šikmém slad. agaru

Substrát	Spotřeba ml 0,25 N NaOH na 100 ml substrátu			pH			Laktosa		Celkové bílkoviny	
	trvání pokusu v hodinách									
	0	24	76	0	24	76	0	24	0	24
Kyselá syrovátka	27	21	1,—	4,4	4,6	7,5	3,8	3,8	0,49	0,50
Sladká syrovátka	12	6	0,5	5,3	6,2	7,6	4,7	4,7	0,62	0,65

Kultivace *O. lactis* na sterilní syrovátce o různé kyselosti se projevuje předně různým spádem rozrušení kyseliny v substrátu přítomné. Obsah laktosy a bílkovin zůstává v podstatě nezměněn (tab. 1).

Tab. 2. Kultivace *O. lactis* na sterilní a nesterilní syrovátce. Syrovátka nesterilní naočkována 1 % smetanového zákysu. Teplota laboratorní. Očkováno přímo celou kulturou *O. lactis* na šikmém slad. agaru

Substrát	Spotřeba ml 0,25 N NaOH na 100 ml substrátu					pH					Laktosa %				
	trvání pokusu v hodinách														
	0	22	42	66	90	0	22	42	66	90	0	22	42	66	90
Sterilní syrovátka	20	—	13	3	1	4,4	4,3	5,8	6,4	6,7	4,28	4,19	4,28	—	4,19
Nesterilní syrovátka	27	21	16,5	19	21	4,2	4,1	5,1	4,7	4,2	4,55	4,—	3,81	—	3,04

Při sledování změn způsobených *O. lactis* ve sterilní a nesterilní syrovátce (tab. 2) bylo zjištěno, že u sterilní syrovátky došlo téměř k úplnému odbourání přítomné kyseliny, aniž se při tom prakticky změnil obsah laktosy. U nesterilní syrovátky

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

byla laktosa odbourávána a následkem toho nastal po počátečním poklesu kyselosti její opětný vzestup.

Tab. 3. Kultivace *O. lactis* na nezředěné a zředěné syrovátce frakcionovaně sterilisované. Syrovátka zředěna 1 : 6

Substrát	Trvání pokusu v hod.	pH	Spotřeba ml 0,10 N NaOH na 100 ml substrátu	Laktosa %	Rozpustné bílkoviny %
Syrovátka nezředěná	0	4,15	6,40	3,71	0,41
	24	4,40	5,32	3,66	0,43
	45	4,60	4,78	3,62	0,43
	69	4,45	4,95	3,52	0,43
	117	4,50	4,89	3,52	0,43
Syrovátka zředěná	0	4,95	0,70	0,43	0,17
	24	4,95	0,43	0,45	0,14
	45	5,20	0,43	0,43	0,12
	69	5,20	0,43	0,47	0,10
	117	6,70	0,05	0,45	0,06

Nezředěná syrovátka se během aerace mírně infikovala. Proto byla laktosa částečně odbourávána. U syrovátky zředěné, kde infekce prokázána nebyla, se obsah laktosy prakticky nezměnil (tab. 3). Pokles kyselosti souhlasí s nálezy předcházejících pokusů.

Tab. 4. Stacionární kultivace *O. lactis* na zředěné syrovátce, frakcionovaně sterilisované. Syrovátka zředěna 1 : 6

Substrát	Trvání pokusu v hod.	pH	Spotřeba ml 0,10 N NaOH na 10 ml substrátu	Laktosa %	Rozpustných bílkovin %
Zředěná syrovátka	0	4,7	0,75	0,61	0,16
	117	7,7	0,05	0,63	0,16

Z výsledků je zřejmé (tab. 4), že obsah laktosy a rozpustných bílkovin se nezměnil ani po 5 dnech kultivace *O. lactis*, při čemž však byla odbourána téměř věškerá kyselost.

Tab. 5. Kultivace *O. lactis* na substrátu podle Niklase. Substrát frakcionovaně sterilisován. Substrát s 1 % laktosy měl pH upraveno přidáním NH_4OH na 4,8. Substrát bez laktosy měl pH upraveno pomocí NH_4OH na 8,5 a pak okyseleno kyselinou mléčnou na pH 4,7

Substrát	Trvání pokusu v hod.	pH	Spotřeba ml 0,10 N NaOH na 10 ml substrátu	Laktosa %	Dusík celkem %
Substrát s 1 % laktosy	0	4,8	6,77	0,90	0,03
	24	4,9	6,02	0,89	0,03
	45	5,1	5,26	0,87	0,03
	69	5,2	4,62	0,87	0,03
	117	5,4	2,36	0,87	0,03
Substrát bez laktosy	0	4,7	8,06	—	0,04
	24	5,—	6,66	—	0,04
	45	5,2	5,26	—	0,04
	69	6,2	2,04	—	0,04
	117	7,6	0,43	—	0,04

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Na Niklasově syntetické půdě (tab. 5) jsou potvrzeny výsledky předcházejících pokusů.

Tab. 6. Kultivace *O. lactis* na syrové syrovátce. Syrovátka zředěna 1 : 5

Substrát	Trvání pokusu v hod.	pH	Spotřeba ml 0,10 N NaOH na 10 ml substrátu	Laktosa %	Rozpustné bílkoviny %
Naočkov. *O. lactis*	0	4,7	1,07	0,87	0,17
	24	3,7	1,61	0,76	0,17
	46	3,8	1,40	0,62	0,17
	94	4,3	1,72	0,25	0,14
	142	4,2	2,79	0,12	0,14
Nenaočkov. *O. lactis*	0	4,5	0,96	0,87	0,17
	24	4,2	1,61	0,87	0,17
	46	3,9	3,01	0,58	0,17
	94	3,4	9,10	0,12	0,14
	142	3,5	9,46	—	0,14

Z tab. 6 je zřejmé, že *O. lactis* odbourává kyselinu vytvořenou jinými mikroorganismy. Nebyla-li do syrové zředěné syrovátky naočkována *O. lactis*, zvyšovalo se nápadně množství kyseliny vzniklé rozbouráním laktosy. Laktosa byla tedy odbourávána i bez přítomnosti *O. lactis*. Obsah rozpustných bílkovin zůstal téměř nezměněn.

Tab. 7. Kultivace *O. lactis* na sterilní a surové odpadní vodě. Odpadní voda z mlékárenské jímky zatížena syrovátkou (poměr 6 dílů vody, 1 díl syrovátky). Sterilisace. V druhé variantě pokusu totéž, avšak substrát nesterilisován

Substrát	Trvání pokusu v hod.	pH	Spotřeba ml 0,10 N NaOH na 10 ml substrátu	Laktosa %	Rozpustné bílkoviny %
Sterilis. odp. voda naočkov. *O. lactis*	0	5,4	0,75	0,60	0,13
	46	5,3	0,43	0,60	0,11
	70	5,4	0,43	0,55	—
Nesteril. odp. voda neočkov. *O. lactis*	0	5,1	0,64	0,64	0,16
	46	3,9	1,18	0,32	0,08

Byla-li mlékárenská odpadní voda sterilisována a pak naočkována *O. lactis*, k odbourávání laktosy došlo až po infekci substrátu (provzdušňováním). Po 70 hodinách provzdušňování činil pokles laktosy pouze 0,05 %. Na stejném, avšak nesterilním substrátu, bylo možno zaznamenat již po 46 hodinách 50% pokles obsahu laktosy.

Diskuse

Z pokusů je zřejmé, že použitý mikroorganismus *Oospora lactis* nemá vlastnosti, které mu byly přisuzovány. Přesto však při čištění odpadních vod mlékárenských tímto způsobem bylo dosaženo poměrně dobrého čisticího účinku.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Mlékárenské odpadní vody jsou nejvíce znečištěny látkami organickými, a to hlavně laktosou, bílkovinami a různými mikroorganismy. Jak ukazují výsledky našich pokusů, je laktosa, která nejvíce zatěžuje příslušné odpadní vody, touto mikroflorou rozbourávána na kyselinu mléčnou a i na jiné kyseliny. Pravou příčinou rozbourávání laktosy je tedy původní mikroflora odpadních vod mlékárenských. Teprve vzniklé kyseliny jsou mikroorganismem *O. lactis* během procesu stravovány, po případě po zavápnění kádě neutralisovány. Z našich pokusů je také zřejmé, že tak zvané „řezání kádě" stejně jako snahy o kontinuální proces jsou plně oprávněné. Při těchto pochodech jde v podstatě o snahu prodloužit kvašení na 48 i více hodin a o postupné přidávání odpadní vody neprokvašené k odpadním vodám již částečně prokvašeným. Tím se pro odbourávání laktosy účelně využívá mikroflory, která se samovolně prosadila během čisticího procesu.

Pokud se týká snížení obsahu bílkovin, je zřejmé i z našich pokusů, že během 24 hodin nemohlo dojít i za optimálních podmínek k 61 až 79% snížení obsahu bílkovin způsobenému fermentací, což jsou hodnoty udávané jako minimum a průměr snížení (Jonáš 1951). To lze vysvětlit pouhou sedimentací prokvášených odpadních vod, jejíž účinek je urychlován přidáním vápenného mléka. Nutno též zdůraznit, že Jonáš (1951) konal pokusy převážně s odpadními vodami z výroby sýrů. Při počátečním odběru vzorků, při provzdušňování, tvořil sýrový prach pravděpodobně podstatnou část odebraných vzorků, zatím co při odběru vzorků po vápnění a sedimentaci byly tyto jemné suspensoidní částice strženy ke dnu vytvořeným kalovým mrakem.

Velké kolísání čisticích účinků Jonášovy metody lze vysvětlit nestejným obsahem mikroorganismů v odpadních vodách, různou aktivitou mikroorganismů, nestejnou dobou kvasného procesu, různou bakterijní čistotou zákvasné kultury *O. lactis* a pak teprve též měnlivým organickým složením mlékárenských odpadních vod.

U zkyslé syrovátky je čisticí účinek menší, poněvadž vytvořená kyselina mléčná brzdí další mikrobní destrukci laktosy. To je všeobecně známo na př. u bakterií mléčného kysání. Je to též patrno na př. v pokusech uvedených v tabulce 1. Zatím co v pokusu se sladkou syrovátkou odbourání titrační kyselosti proběhlo během 24 hodin z 50 %, v pokusu s kyselou syrovátkou za tutéž dobu nebylo odbouráno ani 25 %. Tyto rozdíly je možno pozorovat i ve změnách pH.

Vliv desinfekčních prostředků se předně mohl projevit na mikrofloře odbourávající laktosu. *Oospora lactis* podle literárních údajů (Jonáš 1943) je vůči desinfekčním prostředkům značně odolná.

Jonáš (1951) se domnívá, že i ostatní organické látky se v přítomnosti laktosy štěpí současně a lépe. Jelikož druhou hlavní organickou složkou odpadních vod mlékárenských jsou bílkoviny, předpokládáme, že pod slovy „ostatní organické látky", jsou míněny především bílkoviny. Zde pak upozorňujeme na názor Pienův (1952), že se až dosud nepodařilo v odpadních vodách mlékárenských odbourat pomocí rychlé fermentace současně laktosu a dusíkaté látky, a to pro různé fysiologické požadavky mikroorganismů, účastnících se rozkladu laktosy a bílkovin.

Dosažený čisticí účinek, nepřihlížíme-li k mylnému výkladu jeho vzniku, byl za tehdejšího stavu zajisté úspěchem v tomto oboru. Všimneme-li si však obsahu laktosy v odpadních vodách, které byly čištěny při výzkumu této metody, musíme konstatovat, že koncentrace laktosy v nich (0,33 až 0,75 %) odpovídá asi 7 až 16 % jejich zatížení syrovátkou. Sám Jonáš (1951) však připouští, že i při řádném podchycení syrovátky v sýrárnách a tvarohárnách přijde do odpadních vod asi 15 až 30 % syrovátky. Dosahovalo-li se při 7 až 16 % zatížení odpadních vod syrovátkou snížení jejich znečištění o 50 až 70 % BSK, pak je zřejmé, že při vyšším obsahu syrovátky by se tato bilance ještě více zhoršila. Nutno si uvědomit, že zbytek 30 až 50 % BSK je vzhledem k počátečnímu vysokému stavu BSK stále ještě enormním zatížením (ku př. snížení z 6.108 na 1.313 BSK, nebo z 5.532 na 2.036 BSK).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Tento stav lze těžko obhájit názorem, že „v odpadních vodách vyčištěných touto metodou zůstávají hlavně látky níže molekulární, které se dále hnilobně nerozkládají, takže vyčištěné vody jsou lépe zpracovatelné při dočišťování . . .“ (Jonáš 1952). Naopak v literatuře se setkáváme s názorem právě opačným. „Jestliže provádíme pouze fermentaci laktosy, dochází k počátečnímu narušování dusíkatých látek (jako výsledek mikrobního metabolismu), které dává vznik četným molekulám polypeptidů, jež průběhem samočištění kladou příliš velký požadavek na biologickou spotřebu kyslíku.“ (Pien 1952). Je tedy pravděpodobné, že právě zbytek takto narušených dusíkatých látek, případně společně s laktosou, zbývající v odpadních vodách po skončení čisticího procesu, je příčinou tak vysokého BSK vyčištěných vod.

Své pokusy a názory zveřejňujeme ve snaze přispět k dalšímu úspěšnému vývoji čištění odpadních vod mlékárenských. Jonášova metoda čištění odpadních vod mlékárenských byla u nás v letech svého vzniku prvým, v provozu skutečně ověřeným způsobem, který měl širší zaměření, totiž využití čisticích procesů k výrobě krmiv. Je třeba usilovat o to, aby cenných zkušeností, nabytých při pokusech s ní jakož i při její kritice, bylo využito k dalšímu vývoji jak v čištění odpadních vod, tak i k jejich případnému využití.

Objasnění funkce *Oospora lactis* při čištění odpadních vod mlékárenských přímo vybízí k prověření fysiologických schopností tohoto mikroorganismu při čištění difusních a řízkolisových vod cukrovarských. Je možné, že náležité osvětlení těchto schopností by podstatně přispělo k zlepšení celého čisticího procesu.

Souhrn

Analysovali jsme pravé příčiny dosahovaných čisticích účinků odpadních vod mlékárenských, čištěných pomocí *Oospora lactis*.

Na základě pokusů jsme dospěli k názoru, že použitý kmen *O. lactis* nemá oněch fysiologických vlastností, které u něj byly předpokládány. Prokázali jsme neschopnost *O. lactis* odbourávat přímo laktosu ve větších množstvích. Probrali jsme i otázku možného zkvašování bílkovin.

Z našich pokusů je zřejmé, že odbourávání laktosy v odpadních vodách je způsobeno jinými, tam přítomnými mikroorganismy. Teprve činností těchto mikroorganismů vzniklá kyselina je odbourávána pomocí *O. lactis*. Kromě toho *O. lactis* hraje podpůrnou roli při zachycování suspendovaných organických látek pomocí vláknitého mycelia při zavápnění.

Zaujali jsme rovněž kritické stanovisko k ostatním výkladům čisticího procesu (neškodnost zbývajících balastních, níže molekulárních látek).

Uvedené výsledky vybízejí k přezkoušení fysiologických vztahů *O. lactis* i vůči sacharose.

Literatura

Janke, A.: *Allgemeine technische Mikrobiologie.* Dresden 1924.

Jonáš, V.: *Technologie drožďářství. I.* Olomouc 1943.

Jonáš, V.: *Čištění a zužitkování odpadních vod průmyslu výživy.* Průmysl výživy 1 : 18, 1950.

Jonáš, V.: *Způsob výroby látek bohatých na bílkoviny stupňovitým kvašením za současného chemického a biologického čištění prokvášených kapalin.* Čs. patent 82908. Praha 1951.

Jonáš, V.: *Závěrečná zpráva o provozním výzkumu čištění odpadních vod mlékárenských za r. 1951.* (Nepublikováno.)

Jonáš, V.: *Čištění a zužitkování odpadních vod mlékáren.* Průmysl potravin 3 : 265, 1952.

Jörgensen, A.: *Mikroorganismen der Gärungsindustrie.* Berlin 1909.

Lafar, F.: *Handbuch der technischen Mykologie.* Jena 1904—1907.

Laxa, O.: *Chemie mléka. Metodika.* Praha 1944.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Lembke, A., Delitsch, H.: *Ergebnisse der theoretischen und angewandten Mikrobiologie. I. Systematik der Schimmelpilze.* Neudamm 1943.
Löhnis, F.: *Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie.* Berlin 1910.
Marek, E., Svoboda, M., Jelínek, K., Šalplachta, J.: *Průzkum konstrukcí technických zařízení pro čištění odpadních vod mlékárenských cestou chemickou a fysikální.* Závěrečná zpráva za r. 1954. (Nepublikováno.)
Orla-Jensen, S.: *Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft.* Jena 1913.
Pein, J.: L'industrie laitière. No 75, 1952.
Teichert, K.: *Beiträge zur Biologie einiger in Molkereiprodukten vorkommenden Schimmelpilze. I.* Milchzeitung (51) 1902. Ref. Zbl. Bakter. II. Abt., 10 : 219, 1903.
Vintika, J.: *Metodika mikrobiologického zkoušení mléka.* Praha 1951.

К вопросу очистки сточных вод заводов по переработке молока при помощи Oospora lactis

М. Свобода и Я. Шалплахта

Резюме

Мы произвели анализ истинных результатов очистки при помощи Oospora lactis сточных вод заводов по переработке молока. На основании собственных опытов сбраживания мы пришли к заключению, что применявшийся для этого штамм O. lactis не обладает теми физиологическими свойствами, наличие которых у него предполагалось. Мы доказали неспособность O. lactis непосредственно устранять лактозу в больших количествах. Мы рассмотрели также вопрос возможного сбраживания белковых веществ.

На основании собственных настоящих и прежних опытов и с учетом данных литературы мы приходим к заключению, что устранение лактозы из сточных вод вызывается другими находящимися в воде микроорганизмами. Только кислота, возникающая в результате деятельности этих микроорганизмов, устраняется при помощи O. lactis. Кроме того O. lactis играет вспомогательную роль при прибавлении извести, задерживая частицы взвеси органических веществ в своем волокнистом мицелии. Мы отнеслись критически и к остальным моментам толкования очистительного процесса (безвредность остальных балластных низкомолекулярных веществ). Опытом, полученным при применении O. lactis для очистки сточных вод заводов, перерабатывающих молоко, а также при критической проверке этого способа, можно воспользоваться не только для очистки сточных вод, но и при очистительных работах по заготовке кормов. Приведенные результаты требуют пересмотра физиологических отношений O. lactis и к сахарозе.

Some Observations on the Cleansing of Dairy Sewage by Means of Oospora lactis

M. Svoboda and J. Šalplachta

Summary

Analyses were made in an attempt to determine the real reasons why O. lactis has a cleansing effect on dairy sewage. On the basis of our own fermentation experiments we arrived at the conclusion that the strain of O. lactis used does not possess those physiological properties, which it was supposed to have. We demonstrated the inability of O. lactis to destroy large amounts of lactose directly. We also studied the question of the possible fermentation of proteins. From our own experiments, and from our own and other experiences, we conclude that lactose in sewage waters is decomposed by other microorganisms which are present. Only the acid which is produced by the activity of those microorganisms is destroyed by the O. lactis. O. lactis moreover participates in the precipitation of suspended organic matter with the help of its mycelia during treatment with lime. We are also rather critical with regard to the explanations of the cleansing process (harmlessness of the remaining ballast matter and the microorganic matter). Experience with the application of the method employing O. lactis for the cleansing of dairy sewage and a critical evaluation of this method allow the conclusion to be drawn that it may be used for the cleansing of sewage waters and also for cleansing processes in the production of fodder. The results obtained require a revision of the physiological relationships of O. lactis to saccharose.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 4

Nový způsob barvení mikrobů*)

ČESTMÍR KALINA a MILOŠ PADEVĚT

Infekční klinika v Praze 8 — Bulovka
Přednosta kliniky prof. MUDr J. Procházka

Došlo 29. 11. 1955

Odlišení živých mikrobů od mrtvých je stále předmětem mikrobiologických studií. Proto byly vypracovány metody někdy velmi obtížné a těžko reprodukovatelné. První řešil tento problém Ehrlich, který využil redukční schopnosti methylenové modře při intravitálním barvení. Toto tema zpracovali později mnozí autoři. Český biolog Růžička zavedl v roce 1905 metodu odlišení živých a mrtvých buněk, které však nebylo možno použít v mikrobiologii. Dalším zlepšením differenciálního odlišení živých a mrtvých mikrobů byla fluorescenční mikroskopie (Strugger 1940, Mejsel' a Medvedeva 1951). Dále byla provedena celá řada pozorování pomocí 2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloridu (Ried 1952). Zkušenosti s tímto postupem konfrontovaným s jinými vitálními testy a fluorescenční mikroskopií uveřejnil u nás Hercík (1955). Podle dosavadních zkušeností nemůžeme souhlasit s tím, že by některá dosud známá metoda plně odlišila živé mikroby od mrtvých, protože všechny studie sledovaly pouze úsek života nebo smrti mikroorganismu (na př. redukční schopnost). Při sledování biochemických vlastností mikroba *Haemophilus pertussis* jsme si ověřili, že jejich barvitelnost methylenovou modří závisí na délce kultivace (Clark 1928—1931) a dalších podmínkách; rozpracováním tohoto tematu jsme stanovili metodu, kterou lze snadno odlišit formy metabolicky aktivní od inaktivních nejen u *H. pertussis*, ale i u dalších mikrobů.

Materiál a metody

Činidla: 1. Nasycený vodný roztok methylenové modře (Merck); sytíme nejméně 48 hod., těsně před použitím filtrujeme. 2. 5 % roztok ferrikyanidu draselného (uchováváme v temné nádobě). 3. 3% roztok peroxydu vodíku. 4. Nasycený vodný roztok basického fuchsinu.

Tabulka 1.

A	*B*	*C*
Neisseria pharyngis	*Aerobacter*	*Haem. influenzae*
Escherichia coli	*Cor. Diphteriae*	*Pneumococcus v M fázi*
Klebsiella	*Cor. pseudodipht.*	*Pneumococcus v S fázi*
B. Paracoli	*Salmonella Gärtner*	*Neisseira meningitis*
Proteus vulgaris	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus pyogenes*
Salmonella paratyphi B	*Streptococcus foecalis*	*Streptococcus minutus*
Salmonella typhi	*H. parapertussis*	*Streptococcus alfa*
Schigella Sonnei	*Pseudomonas pyocyanea*	*Micrococcus albus*
Salmonella Bareilly	*Mycobact. tbc.*	*Gaffkia tetragena*
Pasteurella multocida	*B. antracoides*	*Ristella melanogenica*
Brucella abortus		*Veillonella*
Haemophilus pertussis		*Listeria monocytogenes*
		Bacillus (species neurčena)

*) Věnováno k šedesátým narozeninám prof. MUDr J. Procházky.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Postup: 1. Běžně zhotovený preparát při použití destilované vody necháme zaschnout na vzduchu, nefixujeme. 2. Methylenová modř 2 min. 3. Opláchneme vodou. 4. Ferrikyanid draselný nebo peroxyd vodíku 10 vt. 5. Opláchneme vodou. 6. Basický fuchsin 30 vt. 7. Opláchneme vodou.

Barvení: Popsanou metodou jsme vyšetřili 35 druhů mikrobů, které byly kultivovány na krevním agaru, na půdě Bordet-Gengouově, případně Löwensteinově. Stáří kultur bylo 24 hodin, u mikroba *H. pertussis* a *parapertussis* 72 hodin, u mykobakteria tbc 6 týdnů.

Jasné kontrastní zbarvení u stejného kmene, t. j. modrozelené a červené, jsme nalezli u bakterií ve skupině A (tab. 1); poměr individuí zbarvených červeně a modrozeleně byl u těchto kmenů asi 50 %. U bakterií skupiny B jsme nacházeli též dvojí barvitelnost. Barva modrozelená přecházela do slabě modré, poměr takto zbarvených mikrobů k červeným byl však podstatně menší než ve skupině předcházející. Popsanou dvojí barvitelnost jsme nenalezli u všech druhů. Bakterie skupiny C se barvily pouze červeně. V těle mikrobů zbarvených modrozeleně až modře jsme nacházeli intracellulárně, polárně uložená granula barvy temně modré nebo temně zelenomodré. K pokusům jsme použili bakterií v jejich klidové fázi. Proto byly také obarveny pětihodinové kultury *Stafylococcus aureus*, u nichž byl nález mikrobů barvících se zelenomodře v kultuře staré 24. hod. minimální. V těchto kulturách se zmnožily mikroby zelenomodře se barvící proti červeně zbarveným (asi 50 % obou druhů). Nová metoda udává pravděpodobně metabolickou aktivitu mikrobů. Z toho důvodu bylo provedeno několik pokusů, které měly tyto vztahy objasnit.

Výsledky a diskuse

Nejprve jsme si chtěli ověřit vliv některých fysikálních a chemických činitelů na bakterie před použitím uvedené metody. Při použití různých fysikálních a chemických prostředků a při usmrcení bakterií se všichni jedinci barvili červeně (tab. 2).

Tab. 2. Barvení různě ošetřených kultur *Proteus vulgaris*

Bakterie	Ošetření	Výsledek barvení
1. *Proteus vulgaris* č. 777	horské slunce 1 hod.	jen červené
Proteus vulgaris č. 777	kontrola	červ. a modrozel.
2. *Proteus vulgaris* č. 224	methylalk. 1 min.	jen červené
Proteus vulgaris č. 224	kontrola	červ. a modrozel.
3. *Proteus vulgaris* č. 224	silně fix. plam.	jen červené
Proteus vulgaris č. 224	kontrola	červ. a modrozel.

Tab. 3. *Proteus vulgaris* kmen č. 169, čtyřhod. kultura

Č.		3 hod.		24 hod.		Citlivost běžnou methodou
		Barva	Kultiv.	Barva	Kultiv.	
1	Kontrola	● ○	+	● ○	+	
2	Penicilin 10 j/l ml	● ○	+	● ○	+	necit.
3	Streptomycin 100 γ/l ml	● ○	+	● ○	+	necit.
4	Aureomycin 200 γ/l ml	●	negat.	● ○	+	necit.
5	Alesten 100 γ/l ml	● ○	+	● ○	+	
6	Teramycin 100 γ/l ml	● ○	+	● ○	+	necit.
7	Chloromycetin 100 γ/l ml	● ○	+	● ○	+	necit.
8	Methylalkohol 20 %	● ○	+	●	negat.	
9	Čpavek 2 %	● ○	+	● ○	+	
10	Chloramin 1 %	● ○	+	●	negat.	

● červené ○ modrozelené

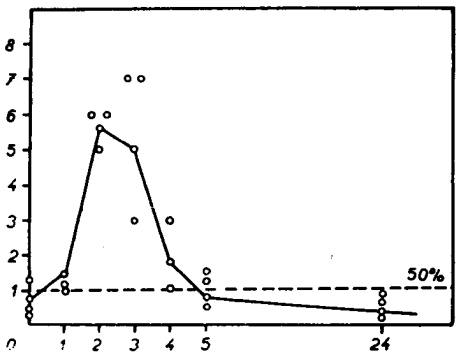
Dále jsme zjišťovali závislost mikrobů barvících se modrozeleně a červeně na jejich růstových schopnostech. K pokusům jsme použili kultury *Proteus vulgaris*, kmen 169, u něhož jsme zjistili běžnou metodou absolutní necitlivost na penicilin (10 j/l ml), aureomycin (100 γ/l ml), streptomycin (100 γ/ml),

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

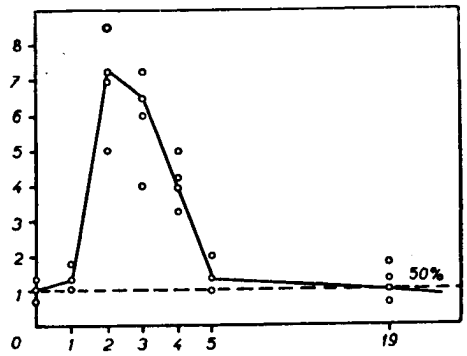
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

terramycin (100 γ/1 ml), chloromycetin (100 γ/1 ml). Tento kmen jsme masivně naočkovali do 100 ml bujonu a po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C jsme bujon rozpipetovali po 10 ml do sterilních zkumavek. Zkumavku č. 1 jsme určili jako kontrolu a v ostatních devíti suspendovali antibiotika, sulfonamid, desinfekční prostředky. Po 3 a 20hodinové inkubaci při 37 °C jsme zhotovili preparáty, které jsme obarvili popsanou metodou a kultury přeočkovali na krevní agar. Tyto subkultury jsme odečítali po 24 hod. a sledovali jsme výskyt modrozeleně a červeně se barvících mikrobů v souvislosti s růstem na subkulturách (tab. 3).

Jak z tabulky vyplývá, nalezli jsme po tříhodinové inkubaci ve všech mikroskopických preparátech modrozeleně a červeně zbarvené mikroby mimo kulturu č. 4, kde byly mikroby obarveny jen červeně. Také subkultura č. 4 zůstala sterilní, zatím co ostatní jevily jasný růst mikroba *Proteus vulgaris*.



Obr. 1. *Proteus vulgaris*.



Obr. 2. *Salmonella pyratyphi* B.

Osa x: čas růstu v hodinách, osa y: index.

Po 20hodinové inkubaci jsme zjistili jen červeně se barvící mikroby v preparátech z kultur č. 8 a č. 10, jejichž subkultury zůstaly též sterilní. V ostatních kulturách jsme nacházeli mikroskopicky modrozeleně a červeně zbarvené mikroby; jejich subkultury vykazovaly růst mikroba *Proteus vulgaris*.

Dalším úkolem bylo sledovat barvitelnost mikrobů v různých fázích jejich růstu. Do kapky bujonu jsme suspendovali známý kmen *P. vulgaris* a *S. paratyphi* B. Suspensi jsme přenesli sterilní pipetou na krevní agar. V jednotlivých intervalech jsme zhotovili přímé obtisky z půdy a barvili popsanou metodou. V preparátech jsme sledovali poměr zelenomodře a červeně se barvících mikrobů pomocí mřížky v okuláru mikroskopu. Počítali jsme vždy 5 × 3 čtverce a ze získaných hodnot zelenomodře a červeně zbarvených mikrobů stanovili průměrnou hodnotu a index *I*, který udává poměr modrozeleně a červeně obarvených buněk. Výsledky jsou uvedeny na obr. 1 a 2.

Tab. 4. *Staphylococcus aureus* kmen č. 915, tříhod. kultura

		37 °C				55 °C				75 °C				100 °C				% smrtnost
č.	zředění	myš č.	prep.	kult.	uhyn.	myš č.	prep.	kult.	uhyn.	myš č.	prep.	kult.	uhyn.	myš č.	prep.	kult.	uhyn.	
1	10^{-2}	1	●○	+	+	2	●○	+	+	3	●	—	—	4	●	—	—	50
2	10^{-4}	5	●○	+	+	6	●○	+	—	7	●	—	—	8	●	—	—	25
3	10^{-6}	9	●○	+	—	10	●○	+	—	11	●	—	—	12	●	—	—	0
4	10^{-8}	13	●○	+	—	14	●○	+	—	15	●	—	—	16	●	—	—	0

● červené ○ modrozelené

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Při sledování růstu mikrobů *P. vulgaris* a *S. paratyphi* B na pevné půdě (krevním agaru) novou metodou jsme zjistili, že modrozeleně se barvících mikrobů přibývá do 2 hodin růstu. Pak opět počne přibývat mikrobů červeně zbarvených, až v 5. hodině růstu hodnoty přibližně odpovídají hodnotám výchozím.

Další pokusy měly zjistit závislost mezi modrozeleným a červeným zbarvením mikrobů k živému organismu. Kmen *Staphylococcus aureus* č. 915 jsme naočkovali do 4 ml bujonu a inkubovali při 37 °C 3 hodiny. Pak byla provedena titrační řada ředěním Ringrovým roztokem 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}. Každé ředění jsme rozpipetovali do 4 zkumavek. Zkumavku č. 1 jsme ponechali při teplotě 37 °C. Na zkumavku č. 2 bylo působeno 15 min. 55 °C ve sterilisátoru, na zkumavku č. 3 75 °C a na zkumavku č. 4 100 °C. V dalších ředěních byl pokus opakován stejným způsobem. Takto přeočkované kultury jsme přeočkovali na krevní agar, zhotovili z nich mikroskopické preparáty, které jsme obarvili novou metodou a vždy 0,5 ml každého vzorku vstříkli bílé myšce intraperitoneálně (desetidenní myšky stejné váhy). Po uhynutí jsme myši pitvali a provedli kontrolní kultivace z orgánů.

Zjistili jsme (tab. 4) přítomnost zelenomodře zbarvených mikrobů v ředěních 10^{-2} až 10^{-8} u vzorků, na něž bylo působeno teplotou 37 a 55 °C. U ředění 10^{-2} až 10^{-8} u vzorků, na něž bylo působeno teplotou 75 a 100 °C, jsme nalezli jen mikroby barvící se červeně. Také kultivace vzorků, na které bylo působeno 75 a 100 °C, zůstaly sterilní, zatím co ostatní vykazovaly růst stafylokoka. Myši, které byly očkovány ředěním 10^{-2}, na které bylo působeno teplotou 37 a 55 °C, uhynuly po 48 hod. Myš č. 5, očkovaná zředěním 10^{-4}, na které bylo působeno 37 °C, uhynula po 72 hod. Ostatní myši zůstaly na živu bez příznaku onemocnění. U všech uhynulých myší byl kultivačně zjištěn *Staphylococcus aureus*.

Dále jsme zjišťovali závislost poměru zelenomodře zbarvených mikrobů k červeným (indexu) k smrtnosti myší. Oxfordský kmen *Stafylococcus aureus* jsme naočkovali do 10 ml bujonu a inkubovali při 37 °C 3 hodiny. Pak byl do 3 zkumavek rozpipetován po 9 ml Ringrův roztok a do každé zkumavky přidáno po 1 ml kultury (ředění 10^{-2}). Zkumavka č. 1 byla ponechána při teplotě 37 °C, na zkumavku č. 2 bylo působeno 55 °C ve sterilisátoru po dobu 15 min., na zkumavku č. 3 bylo působeno 60 °C. Pak jsme z každého vzorku zhotovili mikroskopické preparáty a barvili je novou metodou. V preparátech jsme počítali index tak, že jsme počítali vždy 10 × 3 čtverce a ze získaných hodnot vzali průměr. Potom jsme kultury přeočkovali na krevní agar. Kulturami jsme naočkovali bílé myšky (10 dnů staré, stejné váhy vždy ve skupinách po osmi) dávkou 0,2 ml intraperitoneálně. Zbytek základní kultury jsme dále inkubovali při 37 °C. Po 24 hodinách růstu bylo s kulturou postupováno přesně stejným způsobem, jak jsme uvedli u kultury tříhodinové. Uhynulé myši jsme pitvali a jejich orgány kultivovali.

Tab. 5. *Staphylococcus aureus* kmen „Oxford"

	Zředění	Počet myší	Teplota	Uhynutí myší				Přežilo	% úmrtnosti		Index	
				do 24 h.	do 48 h.	do 72 h.	Celk.			∅		∅
3 hod. kult.	10^{-2}	8	60 °C	8	0	0	8	0	100	91,5	1,6	1,17
		8	50 °C	8	0	0	8	0	100		1,03	
		8	37 °C	6	1	0	7	1	87,5		0,9	
24 hod. kult.	10^{-2}	8	37 °C	2	1	0	3	5	37,5	28,7	0,6	0,4
		8	50 °C	2	0	1	3	5	37,5		0,5	
		8	60 °C	0	1	0	1	7	12,5		0,1	

Index = poměr zelenomodře zbarvených mikrobů k červeným.

Při stanovení indexu jsme zjistili, že byl nejvyšší u tříhodinové kultury (tab. 5). Index byl podstatně zvýšen u všech vzorků tříhodinové kultury proti vzorkům kultury inkubované 24 hodin. Kultivace všech vzorků na krevním agaru vykazovala růst *Staphylococcus aureus*. V pokusu na myších jsme zjistili, že klesání indexu je přímo úměrné snižování mortality myší. Zásadní rozdíl v mortalitě myší jsme zjistili mezi kulturou inkubovanou 3 a 24 hodin, kdy u tříhodinové kultury byla celková mortalita 95,1 %, zatím co u 24hodinové kultury byla jen 28,7 %. V souhlasu s tím průměrný index tříhodinové

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

kultury byl 1,17 zatím co 24 hod. kultury byl jen 0,4. Též se snižováním indexu se posunoval čas uhynutí myší. U všech uhynulých myší jsme kultivačně zjistili z orgánů *Stafylococcus aureus*.

Dále jsme provedli pokus, jehož cílem bylo zjistit, zda červené zbarvení znamená nutně smrt mikroba. Sledovali jsme index v souvislosti s počtem kolonií.

Zjistili jsme, že není velkého rozdílu v množství kolonií (to je živých mikrobů) v souvislosti s indexem.

Modrozeleně nebo modře zbarvené mikroby při použití popsané metody jsou metabolicky aktivní, jak dokazuje jejich růst v subkulturách, zmnožení v časných stadiích růstu a přímá závislost uvedeného indexu k smrtnosti u myší. Červené zbarvení mikrobů nemusí znamenat nutně jejich smrt, ale metabolickou inaktivitu, jak jsme zjistili v pokusech, které sledovaly souvislost indexu s počtem kolonií. Metoda tedy nediferencuje živého mikroba od mrtvého, ale odlišuje metabolickou aktivitu jejich protoplasmatu od inaktivity. Princip reakcí není ještě znám.

Uvedená metoda nebyla dosud popsána, je jednoduchá, rychlá, snadno reprodukovatelná a použitelná pro široký okruh mikrobů. Splňuje tedy předpoklady jako základ dalších výzkumů. Může pomoci při studiu růstových fází mikrobů, jejich odolnosti vůči zevním vlivům, lékům a desinfekčním prostředkům. Může dále pomoci při výzkumu zlepšování kultivačních prostředí.

Souhrn

1. Popsali jsme novou metodu barevného odlišení mikrobů metabolicky aktivních od inaktivních jako základní práci k řešení podmínek jejich růstu, odolnosti, vlivu léčiv a desinfekčních prostředků.

2. Metoda spočívá v barvení nefixovaných bakterií methylenovou modří, pak v oxydaci ferrikyanidem draselným nebo peroxydem vodíku a v dobarvení basickým fuchsinem.

3. Touto metodou se dělí bakterie do dvou skupin. Do skupiny, u níž nastává dvojí barvitelnost (barva modrozelená až modrá u metabolicky aktivních a barva červená u inaktivních) a do skupiny, u níž tento jev nenastává.

4. Metodu jsme ověřili sledováním vlivu některých fysikálních a chemických faktorů na bakterie před použitím uvedené metody, zjišťováním závislosti mikrobů modrozeleně a červeně se barvících k jejich růstovým schopnostem, sledováním barvitelnosti mikrobů v různých fázích jejich růstu a stanovením indexu (to je poměru zelenomodře k červeně se barvícím mikrobům), zjišťováním závislosti obou forem k živému organismu a k smrtnosti u myší. Zjistili jsme, že inaktivita neznamená nutně smrt mikroorganismu.

Literatura

Clark, W. M. et al.: *Studies on oxydation-reduction.* Hygienic. Lab. Treasury Dep. U. S. Public Health Service. VIII. Washington 1928—1931.

Hercík, L.: *Vitální testy na anaerobních bakteriích.* Dipl. práce biol. fak. KU Praha 1955.

Mejsel', M. N., Medvedeva, G. A.: *Problema fluorescentnoj mikroskopiji v mikrobiologiji.* Vestnik AN SSSR 9 : 87, 1951.

Ried, W.: *Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthese und ihre Bedeutung als Reductionsindikatoren und Vitalfarbstoffe.* Ang. Chemie 64 : 391, 1952.

Růžička, Vl.: *Příspěvek k poznání nového rozdílu mezi živým a mrtvým protoplasmatem.* Rozpravy České akademie XIV-II-1905.

Strugger, S.: *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen.* Z. Naturwiss. (Jena) 73 : 97, 1940.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Новый способ окраски микробов

Ч. Калина и М. Падевет

Резюме

Описывается новый метод дифференциальной окраски активных и инактивных с точки зрения метаболизма микробов, — как исходной работы при определении условий их роста, устойчивости, влияния на них лекарственных и дезинфекционных средств. Метод заключается в окраске незафиксированных бактерий метиленовым синим при последующем окислении с помощью красной кровяной соли или перекиси водорода и докраске основным фуксином. С помощью этого метода бактерии распределяются на 2 группы: на двоякоокрашивающуюся группу (синезеленым и даже черным у клеток с активным метаболизмом) и красным у инактивных клеток) и на группу, у которой это явление не наблюдается. — Метод был проверен путем исследования влияния на бактерии некоторых физических и химических факторов, действовавших до применения предлагаемого метода; путем определения зависимости синезеленой и красной окрашиваемости микробов от их способности к росту; путем исследований окрашиваемости микробов в различные фазы их роста и определения индекса (т. е. количественного соотношения между микробами, окрашивающимися синезеленым и красным цветом); путем определения зависимости обеих форм окрашиваемости от живого организма и от смертности у мышей. Мы установили, что инактивность не должна обязательно означать смерть микроорганизма.

A New Method of Staining Micro-organisms

Č. Kalina and M. Padevět

Summary

A description is given of a new method of staining, for differentiating metabolically active from inactive micro-organisms, as the basis for resolving the conditions of their growth and resistance and the influence of drugs and disinfectants. The method consists in staining non-fixed bacteria with methylene blue, then in oxidation with potassium ferrocyanide or hydrogen peroxide and in staining finally with basic fuchsin. By using this method the bacteria are divided into two groups, a group in which double staining occurs (bluish-green to blue in metabolically active bacteria and red in inactive) and a group in which this does not occur. The method was verified by studying the influence of certain physical and chemical factors on the bacteria before using the method, by ascertaining the relationship of the microorganisms staining bluish-green and red to their ability to grow, by observing staining of the micro-organisms at various stages of their growth and by establishing an index (the proportion of bluish-green staining to red staining organisms), and by ascertaining the relationship both forms to the living organism and to mortality in mice. It was found that inactivity does not of necessity mean the death of the micro-organism.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií*)

Jedním z vědních oborů, který neustále upoutává pozornost veřejnosti, je mikrobiologie. Tento zájem je možno vysvětlit tím, že právě mikrobiologie v posledních desítiletích dosáhla význačných úspěchů v rozličných oborech lidské činnosti. Nejen, že byla odhalena většina původců nakažlivých nemocí, ale byla také nalezena účinná opatření a účinné léky proti nim. Zvláště v poslední době bylo využito produktů výměny látkové jedněch mikroorganismů k potírání škodlivých mikroorganismů jiných. S dalším pokrokem biologické vědy se objevují nová a nová antibiotika a zlepšuje se způsob jejich aplikace. A není to jenom lékařství, kam mikrobiologie zasahuje: úspěchy při zvyšování výnosů zemědělských plodin za pomoci očkovacích látek podnítily zájem o mikrobiologii u pracovníků v zemědělství, kde byly do nedávna známy jen škodlivé mikroorganismy fyto- a zoopatogenní.

V kvasném průmyslu byla činnost mikroorganismů, a to zejména kvasinek, známa již po staletí a tisíciletí. Avšak i zde v poslední době se využívá enzymatické činnosti mikroorganismů k novým výrobním procesům, na př. k výrobě organických kyselin, organických sloučenin — rozpustidel, amylolytických preparátů atd. Můžeme říci, že v řadě odvětví stojíme před etapou biologisace výrobních procesů.

S tímto růstem významu mikrobiologie je třeba se vyrovnávat i se základními problémy teoretickými. Je nutno studovat otázky a zákonitosti výměny látkové u mikroorganismů, jejich množení a proměnlivost, které mají význam nejenom pro mikrobiologickou vědu, ale mohou nám dát odpověď i na sporné otázky v biologii.

Abychom mohli ovládat činnost mikroorganismů, musíme znát jejich životní pochody. Nejvýznačnější vlastností mikroorganismů je, jak říká akademik Málek ve své práci „O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií", jejich prudké množení. Chtít využívat vlastností mikroorganismů ať již pro produkci biomasy nebo jejich metabolitů a neznat zákonitošti množení, to by bylo, jako chtít vejce a nevědět při tom, zda je snáší slepice nebo kohout.

Naskýtá se ovšem otázka, zda „nejvýznačnější vlastností mikroorganismů samostatně se množících" (to je bakterií, aktinomycet, plísní a kvasinek) je jen jejich prudké množení. Můžeme se domnívat, že právě tak význačnou vlastností je jejich intensivní a široká enzymatická aktivita, z níž vyplývá jak rychlá výměna látková, tak i prudké množení. Proto také podnítíme-li nějakým faktorem tuto výměnu látkovou, ovládneme i množení.

Akademik Málek vychází ve své práci z dělení bakterijní buňky, přechází na množení v kulturách statických, dále na zákonitosti množení v proudícím prostředí a konečně shrnuje své vlastní poznatky a uvádí některé výhledy do budoucna.

Celkový rozvrh knihy je správný, autor tu postupuje logicky a vyúsťuje v zamyšlení nad tím, jak je možno v široké praxi použít získaných poznatků.

A to je prvním velkým kladem knihy, která se zabývá převážně teoretickými otázkami ve svých prvních oddílech.

Všechno toto bádání nad teoretickými otázkami o dělení a množení bakterií nezůstává samoúčelné, odtržené od praxe, ale přímo vede k využívání poznatků v lékařské a technické praxi, snaží se k této praxi přispět a nutí čtenáře zamýšlet se přímo nad aplikací nových teoretických poznatků.

V úvodu akademik Málek rozebírá teoretické úvahy o množení bakterií. Uvádí, že na př. *E. coli* dá za 24 hodin vznik 5 trilionům jedinců. Uvažuje nad takovou intensitou množení a dovozuje, že je to právě způsobeno tím, že mikroorganismy nejvíce uskutečňují jednotu se zevním prostředím a při množení styčný povrch s prostředím rozšiřují. Mikroby mají velikou asimilovatelnost různých prostředí, využívají nejširších životních podmínek; není snad látek, které by nebyly mikroorganismy napadány. Mikroorganismy žijí ve vodě, vzduchu, v naftě, rozkládají nejenom těžko rozložitelné, někdy i jedovaté sloučeniny organické, ale i rostlinám nepřístupné sloučeniny minerální. Mohli bychom se proto domnívat, známe-li již tolik o životní činnosti mikroorganismů, že dovedeme jejich činnost úplně ovládat. A tu autor tvrdí, že přes veškeré naše znalosti, jakož i široké použití mikroorganismů v průmyslu, jsme nedovedli plně využít jejich nejzákladnějších vlastností: prudkého množení. Ve většině výrob se používá statického prostředí s omezeným množstvím živin. Jakmile mikroorganismy živiny vyčerpají, přestanou růst, množit se a začnou odumírat. Autor dochází k závěru, že statický způsob pěstování mikroorganismů nám nedovoluje využít dynamiky množení, protože tuto dynamiku spoutáváme objemem, v němž množství živin není v poměru k schopnostem množení mikroorganismů.

A nejen to, tento způsob se nehodí ani k plnému rozvinutí teoretického bádání, zejména v otázkách řízené proměnlivosti. Nejpružnější a nejpřizpůsobivější je vždy mladý organismus. Avšak při kultivaci

*) Tento referát byl přednesen na diskusním semináři, pořádaném komisí technické mikrobiologie ČSAV v Praze dne 25. 11. 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

ve statickém prostředí nedostáváme mladé pružné jedince. Proto pěstování v průtokovém prostředí by nám mohlo pomoci k řešení otázek řízené proměnlivosti. Tak pro teoretické bádání i praxi lékařskou, průmyslovou a zemědělskou má být vypracována metoda, která umožní plné rozvinutí dynamiky mikrobního množení a rozvinutí všech enzymatických dějů, to je metoda dynamická, průtoková.

V druhé kapitole, která má zahlaví O dělení bakterií, diskutuje autor s všeobecně tradovaným názorem, že dělení bakterií je pouhé půlení, při kterém mateřská buňka se v určitém okamžiku téměř mechanicky rozdělí na dvě stejné buňky dceřinné. Z tohoto pojetí ovšem vyplývá nesmrtelnost bakterijní buňky. I když se v literatuře někdy objevily některé představy o vývojových cyklech u bakterií, ani tyto názory v základě nezměnily základní představu o dělení mikroorganismů. Akademik Málek polemisuje s uvedeným názorem na dělení bakterijní buňky a uvádí, že bychom v tomto případě „u bakterií měli něco zvláštního, co nemáme u žádných jiných organismů, buňky nemají svou vlastní historii, jsou v podstatě nesmrtelné" (str. 17).

Akademik Málek podotýká, že tohoto nesprávného názoru bylo použito k podpoře reakčních teorií, zvláště Weissmannovy teorie o idioplasmě. Škoda, že autor sám omezil v úvodu kapitoly rozsah své práce a že do ní nepojal otázky bakterijních cyklů a jejich kritické zhodnocení. Vždyť několikráte na problém cyklogenese naráží. Je přirozené, že sledování těchto t. zv. cyklů a jejich správné hodnocení vyžaduje mnoho experimentální práce a vyžaduje postavit si celý problém tak, že vývojový cyklus u bakterií je závislý na podmínkách prostředí. Tento cyklus nemůže být nic fixovaného, daného jen dědičností, ale je velmi složitou reakcí živého organismu na měnící se podmínky vnějšího prostředí. Domnívám se, že bude nutné zabývat se těmito otázkami, zvláště proto, že se objevují, jak později ukážeme, nepřesné názory o stadijnosti bakterií v souvislosti s cyklogenesí. Právě tak není v knize rozvedena otázka vzniku bakterií z nebuněčné hmoty. Je to pochopitelné; tato otázka je příliš složitá a jejím zařazením by se rozsah knihy podstatně zvětšil a ztrácel by na přehledu.

V dalším se autor pozastavuje nad zajímavou skutečností, že dělení bakterijní buňky je ve světové literatuře věnována tak malá pozornost. Na př. Knaysi ve své monografii o bakterijní buňce věnuje dělení jen necelé 4 stránky, z nichž více než jednu zaujímají obrázky. Autor tu uvádí řadu příkladů v historickém přehledu a diskutuje se vžitými názory Topleyovými, Wilsonovými a Hinshelwoodovými.

Akademik Málek uvádí, že kdyby se jednalo o pouhé mechanické rozdělení ve dva stejné dceřinné jedince, pak by oba tito jedinci a z nich i další pokolení museli být stejnorodí. Tato představa však neodpovídá skutečnosti. Každému mikrobiologu je známo, že v kulturách bakterií, dokonce v kulturách kvasinek z jediné buňky jsou jedinci s rozličnou generační dobou, jedinci, kteří se v dělení opožďují za ostatními, jedinci velikostí, tvarem i životaschopností velmi rozdílní.

Autor z toho uzavírá: „že dosavadní badatelé neviděli dělení bakterií biologicky, jako součást hlubokých látkových přeměn v buňce, odtrhovali dělení bakterijní od přeměn v buňce, od její látkové výměny ... dělení samo bylo pro ně dějem čistě mechanickým". Vlastní pokusy autorovy ukázaly, že buňky po dělení nejsou rovnocenné, že v lůně mateřské buňky vzniká buňka nová, dceřinná, při čemž dělení neprobíhá podle nějakého stálého schematu, nýbrž že se některé buňky dělí častěji, jiné zaostávají a konečně umírají. Tak vznikají buňky různého stáří, různé historie a proto také různé budoucnosti. Autor končí kapitolu konstatováním, že vývoj jednotlivých bakterií je hluboce ovlivňován zevními podmínkami. Do jaké míry, to ovšem je třeba ještě studovat. Domnívám se, že tuto kapitolu by bylo třeba ještě prohloubit právě v otázkách vztahu vnějších podmínek na dělení mikroorganismů. A to zejména proto, že ve třetí kapitole (množení bakterií ve statických kulturách) autor často hovoří o vlivu vnějšího prostředí na množení bakterií.

Třetí kapitola má charakter značně polemický. V ní probírá akademik Málek názory na množení bakterií ve statických kulturách a především se vyrovnává s nevědeckou teorií o maximální koncentraci. Jak je toho třeba, je vidět z toho, že až dodnes v publikacích našich autorů je tato teorie nekriticky přijímána. Tak na př. i Duchoslav ve své Mikrobiologii (Praha 1953) ji uvádí bez jakéhokoli kritického zhodnocení.

Akademik Málek poté rozebírá růstovou křivku mikrobů a poukazuje na to, že některé nedůslednosti nebo chyby při výkladu růstové křivky vznikly právě proto, že badatelé pokládali dělení bakterií mechanickým rozpůlením plasmy za axiom. Dokazuje, že „typické růstové křivky nejsou nějakou zákonitostí bakterijního množení nezávislou na podmínkách, kterou bakteriím dáváme ... nejde tu o stadia vývoje, ani nejsou následkem vnitrodruhového boje; naopak jsou důsledkem našich kultivačních podmínek ... proto za přirozenou část oněch růstových křivek můžeme považovat tu část, kde se ještě neprojeví tento rozpor, t. j. období logaritmické". Tak jako období zdržení — tak zvané lag-fáze — jejíž průběh není jednotný a sestává z adaptace mikroorganismů na dané podmínky a pak začátku vlastního množení, tak i fáze logaritmického růstu není dějem jednotným. V jeho průběhu dochází k nápadným změnám množících se mikroorganismů, které je možno sledovat nejen morfologicky, nýbrž i biochemicky.

Autor dál dovozuje, že pěstování ve statických podmínkách není normální, že i přirozená sídliště mikrobů jsou prostředím dynamičtějším, pokud se týče přísunu živin, než statické kultury (strana 85 a další). Autor uvádí, že přesto znalost růstových křivek a jejich podrobné studium jsou důležité, neboť většina dosavadních průmyslových výrob se uskutečňuje ve statických podmínkách. V této kapitole se autor zmiňuje o některých pokusech a názorech Monodových. Myslím, že by bylo účelné

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

některé názory lépe osvětlit a objasnit. Zejména se to týká výtěžku množení, přírůstku v časových intervalech a krátké stati o limitujícím faktoru. Domnívám se totiž, že Monod přejímá některé své závěry z tak zvaného Liebigova zákona minima u rostlin, o jehož správnosti právě Viljams diskutuje.

Ve čtvrté kapitole autor uvádí přístupnou literaturu o průtokové kultivaci mikrobů. Svou pozornost věnuje pracím sovětského badatele Utěnkova a znovu pokusům Monodovým. Konečně uvádí stručný přehled o využití průtokových metod v dosavadní průmyslové praxi a přehled metod kontinuálních. Podle pramenů nám dostupných jsme zjistili, že první popsanou metodou o pěstování mikrobů v proudícím prostředí jsou metody Welleminského (Cbl. Bacter. I. Orig. 42, 1906) a Welleminského a Butschowitze (Cbl. Bacter. I. Orig. 104 : 443, 1927), kde jsou uvedeny i další pokusy autorů jako Appela, Matheye, dnes již neznámých, a j. I když první uvedená metoda měla jednu závažnou chybu, že se v ní nepoužívalo stálého přítoku živin, takže průtok se dál v jakýchsi polostatických podmínkách, měly být Welleminského pokusy registrovány právě jako snaha o zlepšení nevyhovující kultivační metodiky. Dále by bylo také třeba lépe doložit kontinuální nebo průtokové metody používané v našem průmyslu. Chybí zde zmínka o dosavadním způsobu výroby octa atd. O tom bude jistě v diskusi řeč. Pokud se týče kontinuálních metod čištění odpadových vod, nejsou to jen pokusy s uvedenou metodou Jonášovou. Většina metod čištění odpadních vod, biologická filtrace, zkrápěcí filtry a zejména metoda aktivního kalu, jsou metodami průtokovými. Zvláště metoda aktivního kalu by si zasloužila pozornosti jak po stránce praktické, tak po stránce teoretické a jistě by přispěla k řešení otázek pěstování mikroorganismů v proudícím prostředí.

V páté kapitole popisuje akademik Málek své vlastní pokusy s průtokovou metodou, jakož i vývoj laboratorního průtokového zařízení. Je nesporné, že od začátku původních prací zaznamenala Málkova metoda značné zdokonalení a to nejen v aparatuře, ale v rozšiřování své použitelnosti. Autor se zabýval nejen technickým zdokonalením metody a sledováním zákonitostí množení v tekutých kulturách, ale též produkcí biomasy, produkcí některých látek a také proměnlivostí mikroorganismů, která je, jak poznamenává, průtokovou metodou silně ovlivněna. Z dosavadních pokusů vyplývá celá řada závažných závěrů. Autor dokazuje, že po údobí adaptace na průtokové prostředí se mikroby plynule množí a nejeví známek degenerace kultury, naproti tomu se projevuje značná různocennost mikrobních buněk v průběhu množení. V průtokových kulturách bylo dosaženo mnohem vyšších koncentrací mikroorganismů než ve statickém prostředí a ani v těchto vysokých koncentracích nebylo lze pozorovat známky vnitrodruhové konkurence. V průtokové kultuře je možno zachycovat mikroby ve stavu nejaktivnějšího množení, kdy enzymatické procesy jsou nejdynamičtější. Autor podává přehled o řadě svých pokusů s *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, s azotobakterem, se sporulujícím bacilem *B. pumillus*, s penicilii a s kultivací kvasinek. Autor uvažuje o možnostech řízené proměnlivosti, které dává průtoková metoda, a na konec uvažuje o praktickém využití svých poznatků průtokové kultivace. Jako možné výhledy se mu jeví příprava kvalitnějších bakterinů než z běžných statických kultur, dále příprava bílkovinné mikrobní masy, použití v kvasném průmyslu, ve výrobě amylas, kyseliny citronové, antibiotik atd. Často se uvádí, že kontinuální a tedy i průtokové metody mají velké nebezpečí v bakterijní infekci. Na tyto námitky akademik Málek odpovídá, že nebezpečí infekce u průtokových metod je menší než u metod statických. Může tomu tak být v laboratorních podmínkách. Tak akademik Málek uvádí, že kulturní mikroorganismy dokonce dovedou přemáhat v průběhu kvašení průtokovým způsobem náhodnou infekci. Je ovšem otázkou, jak tomu bude za provozních podmínek a zejména při obtížích, které jsou s provozním zařízením jako pumpy, kohouty, ventily atd. To ovšem může ukázat až poloprovozní nebo provozní průtokové zařízení.

Projdeme-li knihu stránku po stránce, vidíme, že úkol, který si akademik Málek vytyčil, byl veliký. Autor se zabýval zákonitostí dělení, množení mikroorganismů, uplatněním průtokových metod a zejména na nich dokazoval nesprávnost některých názorů, polemisoval se zastánci reakčních teorií a své nové průkopnické názory podpíral nejen svými pokusy, ale i na základě kritického rozboru literárních údajů. Není možno probírat všechny i význačnější statě v knize akademika Málka. Vždyť i jistě z řad ostatních účastníků dnešního diskusního dopoledne bude řada připomínek. Proto se omezím jen na některé úvahy z teorie i praxe, kde předpokládám, že by bylo třeba ještě dalšího objasnění v soudružské a plodné diskusi.

První z připomínek se týká dělení bakterií. Je zřejmé, že staré názory o prostém polcení je možno pokládat za překonané na základě faktického materiálu sneseného v knize akademika Málka. Budou zde ovšem určité kvalitativní rozdíly mezi jednotlivými skupinami mikroorganismů. Jinak se množí viry nebo bakteriofágy — pravděpodobně ty uvádí akademik Málek jako samostatně se nemnožící — jinak nastává dělení u vlastních bakterií, u sporotvorných bakterií, u actinomycet (tvorba vzdušného mycelia), u kvasinek a u plísní, význačných tvorbou fruktifikací. Tyto rozdíly v individuálním vývoji bude zapotřebí ještě dále zkoumat, protože mezi těmito skupinami mikroorganismů leží dlouhé éry historického vývoje a přizpůsobení se prostředí. Chování těchto skupin organismů, substrátům a ve tvorbě různých společenstev, kolonií je odlišné, i když vyšší formy mikroorganismů si zachovávají ještě značnou plastičnost a širokou enzymatickou činnost.

Plísně si během historického vývoje přivykly již více na pevný substrát: průtokové prostředí je jistě velmi vhodné pro tvorbu vegetativních forem, ale méně již pro tvorbu fruktifikací. Bude proto zajímavé dále sledovat individuální vývoj a proměnlivost plísní v průtokovém prostředí. S praktického

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

hlediska bude toto prostředí vhodné všude tam, kde se vyhýbáme v provozu tvorbě fruktifikace (výroba amylas, výroba kyseliny citronové). Podobně je tomu i u aktinomycet.

Zemědělské mikrobiology zajímá již delší dobu množení a fixace dusíku azotobakterem. Azotobakter žije v půdě absorbován na půdní částečky nebo na kořenovou zonu rostlin a přece poměry v dodávce živin se neustále mění. Voda obohacená živinami prochází jednou dolů nebo vzlíná vzhůru puzena kapilárními silami. Z toho vidíme, že azotobakter v půdě nežije ve zcela statickém prostředí. Proto by bylo třeba sledovat průtokové prostředí, kde azotobakter by byl do určité míry vázán k pevnému substrátu, ale kde by se reguloval průtok živin, živiny by se vyměňovaly a docházelo by ještě k provzdušnění. Myslím, že by stálo za to sledovat zákonitosti množení půdních mikrobů a zvláště azotobaktera v takovém prostředí, jakého na př. použil Najmr při sledování výměny iontů v půdě. Sami jsme se přesvědčili, že kultura *Pseudomonas aeruginosa*, která již po řadu přeočkování nepigmentovala, při kultivaci na takovém zařízení, zatím ještě primitivním, začla produkovat náhle velké množství barviva. Myslím, že bude nutné promyslet technické zařízení na průtokovou metodu za použití pevného substrátu, zároveň s provzdušňováním.

Vlastní dělení mikrobů je nutno zkoumat zároveň se sledováním podmínek vnějšího prostředí. Není pochyb, že dělení bakterií je proces, který vzniká na základě látkové výměny v mateřské buňce. Nová buňka nevznikne mechanicky, až stará, mateřská dosáhne určitého objemu nebo rozměrů, ale zákonitě, z nutnosti podmíněné vnitřními změnami v původní buňce. Buňka je základem, prostředí je podmínkou buněčného dělení. Proto prostředí vždy bude hrát významnou úlohu a to nejen složením a množstvím živin, nýbrž i vlastnostmi fysikálními (na př. pH, viskosita prostředí, povrchové napětí atd.). Ke změně může dojít tehdy, kdy již stará forma nevyhovuje novému obsahu. Tento rozpor mezi obsahem a formou se řeší vznikem nového jedince. Ve statických kulturách je celkem přirozené, že fysikální a chemické podmínky v celém prostředí nejsou stejné. Vyrovnávání koncentrací živných látek a produktů mikroorganismy se neděje okamžitě a tak se stává, že některá místa a tím i některé mikroby mají méně živin nebo jiné podmínky, než jsou na jiném místě a u jiných mikrobů. Někde může dojít k zvýšenému hromadění metabolitů, protože i v tekutých prostředích mikroorganismy nežijí vždy odloučeně, ale často ve shlucích. Tak se množení stává nestejnoměrným. To můžeme pozorovat zvláště tehdy, když opustíme stěny laboratoře a podíváme se do provozních kvasíren. Je pochopitelné, že sledování dělení a množení kultur ve statickém prostředí nemůže nám dát ty výsledky, které by se daly obecně aplikovat. Je to zvláště tehdy, když přecházíme z laboratorních podmínek k využití výsledků takto získaných v provozním měřítku.

Na stejnorodost nebo lépe stejnocennost buněk mají tedy vliv i tyto podmínky, které si často ani dobře neuvědomujeme. Ovšem ani v průtokových prostředích, kdy zásobování živinami je pravidelnější, není vždy možno dosáhnout homogenního prostředí; jiné podmínky budou při stěnách nádoby, kde bakterie mají tendenci tvořit povlaky. Homogennost prostředí je závislá i na rychlosti průtoku tekutiny, na jejím provzdušňování, na velikosti vzduchových bublinek, atd. Proto sledování dělení a množení mikroorganismů je metodicky velmi obtížné. Při jeho hodnocení stěžuje pozorování ještě skutečnost, že nemáme spolehlivých mikroskopických metod pro rozlišování živých a mrtvých mikroorganismů. Ani metody s metylenovou modří, s kongo-červení, neutrální červení nebo s jinými barvivy nejsou zcela spolehlivé. Určitých výsledků lze dosáhnout diferenciálním barvením podle Erhlicha.

Doc. Dr Jaroslav Vintika

(Dokončení v příštím čísle)

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 31. srpna 1956. - A-15361

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

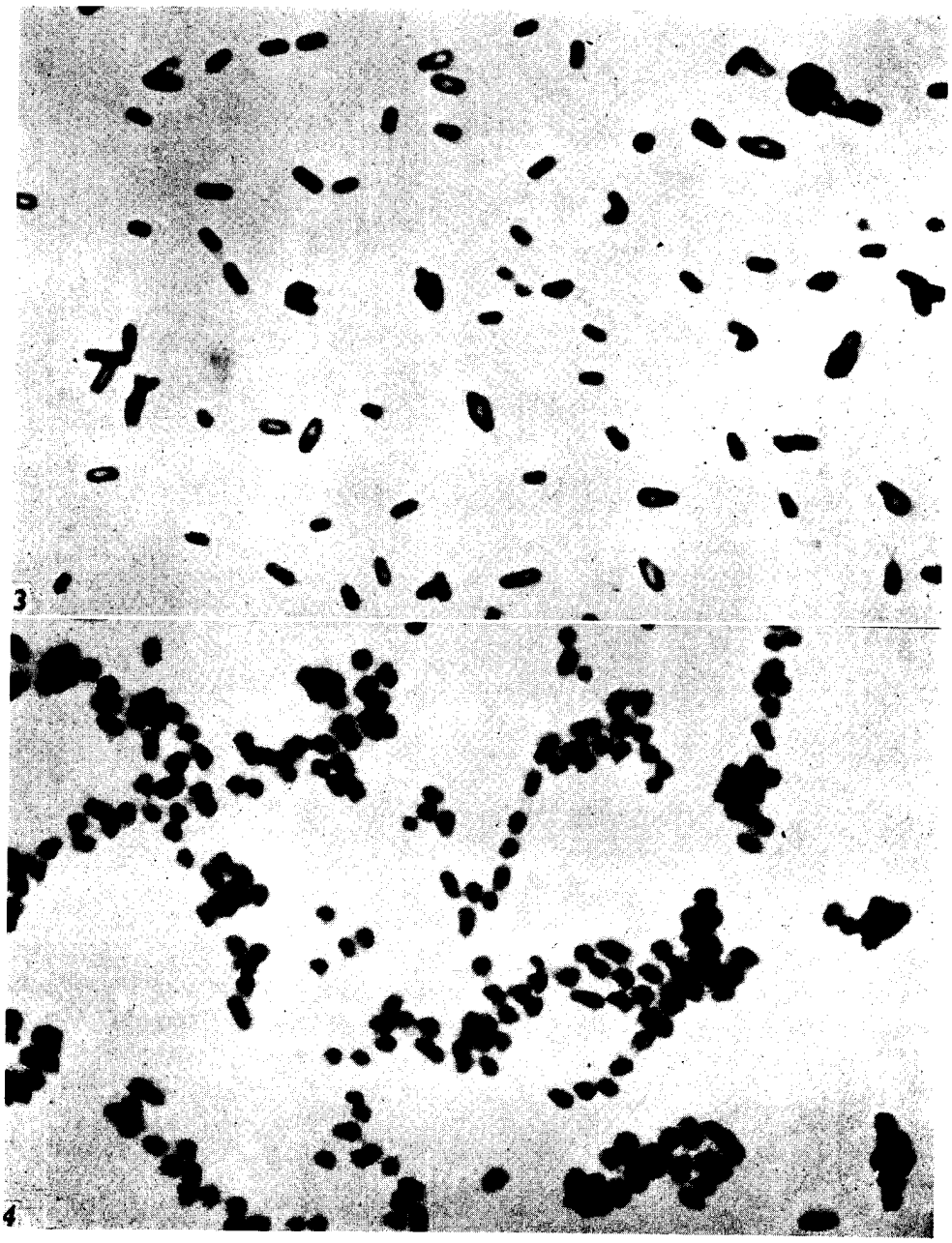
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Obr. 1. Kolonie desulfurikačních bakterií na thigmotaktickém preparátě po 24 hodinách kultivace. Barveno karbolfuchsinem, zvětšení 800krát.

Obr. 2. Bakterie rodu *Desulfovibrio* z 24hod. kultury v živném roztoku s mléčnanem. Thigmotaktický preparát, barveno karbolfuchsinem, zvětšení 1800krát.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1



Obr. 3. Sporulující gramnegativní průvodní bakterie z kultur desulfurikačních bakterií. Agar s mléčnanem. Barveno karbolfuchsinem, zvětšení 1000krát.

Obr. 4. Kokkovité grampositivní průvodní bakterie z kultury desulfurikačních bakterií. Agar s mléčnanem. Barveno karbolfuchsinem, zvětšení 1800krát.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1

NAKLADATELSTVÍ
ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE VĚD

upozorňuje na časopis

Československá morfologie,

který vychází v rámci vědeckých časopisů ČSAV jako sesterský časopis Čs. fysiologie a Čs. biologie. Časopis sdružuje pod vedením akademika J. Wolfa české a slovenské morfology. Potřeba soustředit práce našich morfologických věd v jediném publikačním orgánu byla pociťována již dávno. Teprve možnosti, jaké dává vědě a vědeckým pracovníkům náš lidově demokratický řád, uskutečnily přání českých a slovenských vědeckých pracovníků v morfologii. Redakce, vědoma si tradice čs. morfologie, má zájem na tom, aby časopis čestně representoval morfologickou složku naší vědy, aby po sovětském vzoru pěstoval morfologii jako biologickou vědu o živém těle a na basi dialektického materialismu, aby se přednostně věnoval těm oblastem morfologického výzkumu, jejichž význam pro lékařské vědy je žádoucí, a aby uplatňoval hledisko vývojové a funkční.

Československá morfologie otiskuje z anatomie člověka a z anatomie srovnávací, z embryologie, z histologie a ze srovnávací anthropologie. Uveřejňuje též stručné referáty o aktuálních problémech morfologických věd, příspěvky metodické a technické, zprávy o význačných pracích a pod.

Čs. morfologie je také oficiálním orgánem našich morfologů pro styk se zahraničním vědeckým světem.

Časopis je určen nejen morfologům, ale také lékařům, fysiologům, biologům, anthropologům a všem, kdo se zajímají o přírodní vědy.

Ročně vycházejí 4 čísla po 96 stranách plus 20 křídových tabulek. Cena jednoho čísla Kčs 8,—, roční předplatné Kčs 32,—.

*

Časopis Čs. morfologie si můžete předplatit v administraci časopisů Nakladatelství Československé akademie věd, Praha II, Vodičkova 40. Tamtéž lze objednat kompletní ročníky 1953 a 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500004-1