Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
1
ČÍSLO
5

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, ŘÍJEN 1956 - STR. 193—240

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

Vedoucí redaktor: Akademik IVAN MÁLEK

Členové redakční rady:

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

OBSAH

K. Beran, M. Burger a S. Zelenka: Nové poznatky při použití amylolytických preparátů pro zcukřování bramborových zápar. Poloprovozní pokusy s plísňovými preparáty při výrobě lihu z brambor . . . 193

L. Šilhánková: Selektivní inhibice drsných forem kvasinek . . . 204

Z. Řeháček: Rozšíření aktinomycet v rhizosféře některých obilovin . . . 211

J. Weiser a O. Lysenko: Septikemie bource morušového . . . 216

V. Ševčík, M. Podojil, M. Kyselová a A. Vrtišková: Nové antibiotikum BU 271 . . . 223

J. Szántó a N. Valentová: Dynamika množenia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách . . . 227

Kritiky a recense . . . 237

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

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 5

Nové poznatky při použití plísňových amylolytických preparátů pro zcukřování bramborových zápar

Poloprovozní pokusy s plísňovými preparáty při výrobě lihu z brambor

KAREL BERAN, MIKULÁŠ BURGER a STANISLAV ZELENKA

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha
Ředitel Biologického ústavu akademik Ivan Málek
Vysoká škola chemicko-technologická, katedra technologie glycidů, Praha

Došlo 27. 2. 1956

Mnoho pracovníků se již dlouhou dobu zajímá o použití plísňových amylolytických preparátů v lihovarství. Usilují buď o úplnou anebo částečnou náhradu za slad, nutný pro zcukřování škrobnatých surovin. Prvý, jenž nahradil slad plísní *Aspergillus oryzae*, narostlou na otrubách, byl Takamine (1914) (plísňový slad, takadiastasa). V dalších pracích se ukázalo, že takovýchto amylolytických preparátů lze úspěšně použít při zpracování škrobnatých surovin na líh místo sladu. U nás již v roce 1923 upozornil na možnost použití plísňových kultur v zemědělských lihovarech Zelenka (1923), dále pak Sova (1950, 1953), Stárka (1952) a Kleinzeller (1952).

Při zcukřování škrobnatých surovin plísněmi se používá dvou různých technologických postupů. Při t. zv. způsobu „amylo" (Erb a Hildebrandt 1946) se používá plísní rodu *Rhizopus* či *Mucor*, jež jsou kultivovány aerobně 24 až 48 hodin v zápaře předem ztekucené. Při růstu těchto plísní proběhne zároveň zcukření škrobu a jako následný proces se urychluje kvašení přidáním kvasinek. Tímto způsobem se pracuje ve velkých lihovarech ve Francii, Maďarsku a Rumunsku. Protože u nás mají zemědělské lihovary malou kapacitu a tento způsob vyžaduje složitého strojního zařízení i obsáhlé kontroly, neuhradil by vyšší výtěžek lihu podstatně vyšší náklady.

Větší zájem se soustřeďuje na druhý způsob, při němž se používá dvou druhů plísní rodu *Aspergillus: Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. Pro technologický proces je možno použít preparátů těchto plísní, připravených na pevných substrátech, zejména otrubách (Lu Cheng Hao a sp. 1943, Roberts a sp. 1944, Underkofler a sp. 1939, 1946, Schwene a sp. 1940), i na tekutých substrátech submersně. Jako substrátu bylo též použito sušených a přiživených škrobárenských zdrtků (Sova 1950). Pro kultivaci na tekutých půdách se používá hlavně plísně *A. niger* (Le Mense a sp. 1949, Teixeira a sp. 1950, Adams a sp. 1947). Jedna z výhod při použití těchto preparátů spočívá v tom, že základní technologický proces při výrobě lihu se celkem nemění, jen místo sladu se použije plísňových preparátů.

Při zcukřovacím procesu se přidává 3 až 4 % amylolytických preparátů, připravených kultivací plísně *A. niger* či *A. oryzae* na otrubách v suchém stavu na váhu obilí místo 8 až 10 % zeleného sladu. Preparátů tekutých, připravených submersní kultivací, se přidává 10 až 20 % objemu zápary. Jak bylo dokázáno v mnohých pracích, jsou výtěžky lihu dosažené těmito preparáty a vztažené k výtěžkům teoretickým ve srovnání se sladem při nejmenším tytéž, ale ve většině případů o 2 až 12 % vyšší (Lu Cheng Hao a Jump 1945, Teixeira a sp. 1950, Roberts a sp. 1944, Adams a sp. 1947, Underkofler a sp. 1939, 1946). Je též známo, že kvašení zápar, zcukřených plísňovými preparáty, probíhá rychleji. Též směsí sladu a plísňových preparátů bylo dosaženo vyšších výtěžků při zcukřování obilnin. Jiných výhod použití směsí neskýtá. Vyšších výtěžků však nebylo dosaženo použitím směsi při zcukřování bramborových zápar (Malcher 1954).

Je jasné, že maximální výtěžky lihu závisí především na dokonalé hydrolyse přítomného škrobu na zkvasitelné cukry. Z lihovarské praxe při zpracování brambor i obilnin je známo, že dokonalé převedení zmazovatělého škrobu ve zkvasitelné cukry závisí na těchto dvou podmínkách: 1. Na dokonalém

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

proběhnutí vlastního zcukřovacího procesu, t. zv. zcukření, kdy amylolytický preparát je ve styku s upařeným dílem při zcukřovací teplotě až do dosažení achroického bodu při zkoušce jodovým roztokem. Při tomto procesu se vytváří asi 50 % zkvasitelných cukrů a ostatní množství škrobových molekul se rozpadá v dextriny o kratších či delších řetězcích. S tímto procesem je též spojen jiný technologický problém, ztekucení zápary. 2. Na fázi dokvášení, kdy při kvašení, zejména v pozdějších hodinách, jsou dextriny, vzniklé při procesu zcukřování, dále štěpeny na zkvasitelné cukry (Pan a sp. 1950). Aby k tomuto dalšímu štěpení dextrinů došlo, je nutné, aby amylolytická aktivita užitého preparátu nebyla poškozena neb zničena, což se často stává v provozech zvýšenou teplotou nebo vyšší kontaminací, zejména kyselinotvornými bakteriemi.

Při sledování obou těchto fází štěpení škrobu a dextrinů plísňovými preparáty *A. niger* a *A. oryzae* bylo zjištěno, že důležitým činitelem při hydrolyse celé škrobové molekuly je optimální teplota. Optimální teplota při 60minutovém zcukřování bramborových zápar při použití preparátu *A. oryzae* činí 55 °C, při použití preparátu *A. niger* 65 °C (Beran a Burger 1956, Burger a Beran 1956a). Dodržení teploty je důležité zejména u preparátu *A. niger*, poněvadž jeho hydrolytická činnost je teplotou silně aktivována. Jeho aktivita pro tvorbu zkvasitelných cukrů při hydrolyse škrobu byla 7,34krát větší při 65 °C než při 30 °C, zatím co u *A. oryzae* při 55 °C jen 2,54krát větší (Burger a Beran 1956a). Tyto preparáty se liší též optimálním pH pro dextrinaci škrobu. Pro preparát *A. oryzae* byla nalezena hodnota 6,1, pro *A. niger* 4,5 (Beran a Burger 1956). Možnost použít tohoto nízkého pH u preparátu *A. niger* má důležitý význam pro technologii zemědělských lihovarů. Při tomto pH je již pomnožovací schopnost většiny kontaminujících mikroorganismů silně omezena.

V souvislosti s druhou fází tvorby zkvasitelných cukrů z dextrinů bylo zjištěno, že preparát *A. niger* způsobuje intensivnější hydrolysu dextrinů než *A. oryzae*. Za současného vykvášení kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* R XII vzniklo z přítomných hraničních dextrinů 91,2 % zkvasitelných cukrů při činnosti preparátu *A. niger* a 73,6 % u preparátu *A. oryzae*. Dále bylo zjištěno, že preparát *A. niger* sice intensivně tvoří nezkvasitelné oligosacharidy s 1,6-glukosidickou vazbou (isomaltosa, panosa), avšak tyto oligosacharidy též silně štěpí. Význam tohoto enzymatického systému, štěpícího 1,6-glukosidické vazby, je pro výtěžnost lihu jistě velký. Naproti tomu u *A. oryzae* tato hydrolytická činnost není zjevná (Burger a Beran 1954).

Zatím co úplnou náhradu sladu při zpracování obilí lze podle četných prací pokládat za vyřešenou, při zpracování bramborů se používalo u nás i jinde (Malcher 1954, Šotničenko 1955) jen částečné náhrady sladu, t. j. směsi hvozdněného diastatického sladu s amylolytickým plísňovým preparátem ve snaze získat dobré výtěžky lihu a zabránit technologickým obtížím. Svou prací o optimálních podmínkách pro zcukřování bramborových zápar a touto předkládanou prací se snažíme doplnit tuto mezeru a pokusit se o úplnou náhradu sladu. Předkládaná práce je ověřením teoretických výsledků v praxi.

Materiál a metody

Mikroorganismy a amylolytické preparáty

Použité mikroorganismy. K přípravě amylolytických plísňových preparátů jsme použili těchže dvou druhů plísní *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* jako v předcházejících pracích (Burger a Beran 1954, 1956a, b). K zakvašení sladkých zápar jsme užili drožďárenské kvasinky násadní generace ze Středočeských drožďáren a lihovarů (závod Drožďárna Kolín, n. p.). Při laboratorních výtěžnostních pokusech jsme použili kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* R XII. Kvasinky byly kultivovány na 10 °S sladince při 28 °C.

Základní suroviny. Plísně jsme pěstovali na pšeničných otrubách. K pokusům jsme použili bramborů jednotné sorty Rapid E4 o škrobnatosti 20 %. Jako srovnávacího amylolytického preparátu jsme použili zeleného osmidenního pivovarského sladu, připraveného z druhé třídy ječmene. U laboratorních výtěžnostních pokusů jsme použili sušeného diastatického sladu. Zápary pro laboratorní výtěžnostní pokusy byly připraveny z bramborových vloček s obsahem škrobu 65,68 %.

Příprava amylolytických plísňových preparátů. Pro zcukření zápar v poloprovozních pokusech jsme použili kultury plísní *A. niger* a *A. oryzae*, na vzduchu sušené a mleté, narostlé na sterilních otrubách. Přípravu preparátů použitých při laboratorních výtěžnostních pokusech jsme popsali již dříve (Burger a Beran 1954).

K přípravě preparátů jsme použili hliníkových nebo smaltovaných mis dvou různých velikostí, na něž jsme rozprostřeli sterilní otruby do tenké vrstvy (2,5 cm). Na jedné míse bylo zpracováno 550 g nebo 900 g otrub. Otruby na mísách jsme očkovali rovnoměrným posypáním jejich povrchu směsí spor se sterilními otrubami.

Sporové inokulum jsme připravili z dobře vysporulovaných plísňových kultur, narostlých v Rouxových lahvích na 10 °S sladince ztužené agarem. Spory s povrchu kultury jsme setřeli sterilními otrubami

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

a této směsi použili k inokulaci otrub při vlastní přípravě preparátů. Otruby byly sterilovány dvakrát po 24 hodinách při tlaku jedné atmosfery.

Zaočkované otruby jsme ovlhčili stejnou váhou sterilní vody, mísy přikryli papírovými kryty a umístili v termostatu. Kultivace trvala při 25 °C až čtyři dny. V některých případech bylo nutno přikrápět rostoucí kultury sterilní vodou.

Příprava zápary a postup při laboratorních výtěžnostních pokusech

Přípravu zápary z bramborových vloček jsme popsali již dříve (Beran a Burger 1956). Na rozdíl od popsaného postupu činil objem zápary při výtěžnostních pokusech 200 ml; k pokusům jsme použili 500 ml varných baněk. Zápara obsahovala 15 % škrobu a množství přidávaných preparátů činilo 15 % váhy přítomného škrobu. Preparáty byly přidávány ve dvou částech, 10 % váhy škrobu při zcukření a 5 % před zkvašením. Zcukřování trvalo 1 hodinu při 50 °C preparátem *A. oryzae* a při 60 °C u sladu a preparátem *A. niger*. K zakvášení zápary jsme přidali 10 ml husté kvasničné suspense tak, aby konečná koncentrace kvasničné sušiny činila 0,6 %. Baňky byly uzavřeny kvasnou zátkou a umístěny v termostatu. Kvašení probíhalo při 28 °C 48 hodin.

Základní technologický postup a zařízení

Zařízení. Poloprovozní pokusy jsme konali v pokusném lihovaru katedry kvasné chemie a technologie na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Lihovarská linka sestává z tohoto zařízení: 1. Henzeův pařák na maximální množství brambor 200 kg; 2. zapařovací kád normálního vybavení o obsahu 400 litrů; 3. kvasné kadečky o obsahu 800 litrů, 2 celodřevěné a 2 dřevěné, vyložené měděným plechem; 4. periodický destilační aparát s vařákem o pracovním obsahu asi 300 litrů.

Paření brambor a zcukřování upařeného díla. Vyprané brambory o váze 140 kg jsme v Henzeově pařáku upařili obvyklým způsobem. Kondensní vodu jsme nevypouštěli.

Před začátkem vyhánění upařeného díla byla do zcukřovací kádě vyfouknuta kondensní voda z pařáku, přichlazena na teplotu udržovanou při vyhánění a do ní byl rozmíchán prvý díl amylolytického preparátu. Po vyhnání asi jedné poloviny díla byla přidána druhá část a po skončení vyhánění a upravení zcukřovací teploty třetí část. Rozdíly od tohoto základního postupu jsou uvedeny u příslušných pokusů. Preparáty byly před přidáním zvlhčeny vodou. Dílo bylo udržováno při zcukřovací teplotě jednu hodinu. V některých případech bylo dílo okyseleno kyselinou sírovou na pH 4,5.

Kvašení. Po zcukření byla zápara ochlazena na násadní teplotu 22 až 25 °C. K zakvášení jsme přidali 0,5 kg lisovaného droždí rozmíchaného ve vodě. Kvašení trvalo 72 hodin.

Analytické metody

Škrobnatost brambor jsme stanovili densimetricky. Pařené dílo jsme kontrolovali makroskopicky a upaření mikroskopickým zjištěním rozluštění škrobu. Zjistili jsme, že všechny várky byly dokonale upařeny. Zcukřování jsme sledovali jodovou zkouškou mikroskopicky. Obvyklými metodami jsme stanovili sacharisaci, titrační kyselost, pH, stupňovitost alkoholu, alkohol ve výpalcích, alkohol po novém zkvašení a alkohol po inversi. Alkohol při výtěžnostních laboratorních pokusech jsme zjišťovali po dvojí destilaci pyknometricky. Ve zralé zápaře jsme stanovili neporušenost „diastasy" podle Ellrodta. Redukční mohutnost jsme zkoumali metodou Schoorlovou (Schoorl 1917). Množství redukujících látek jsme vyjádřili jako glukosu. U chromatografických analys bylo použito metody Greenovy a Stoneovy (1952), kterou jsme upravili. Jako standardů jsme použili chromatogramů sladiny a maltosy, inkubované s preparátem *A. niger*, jejichž rozložení cukrů je známé. Při chromatografování sladkých zápar jsme nanášeli na chromatografický papír poloviční množství vzorků než u zápar kvasících a zralých. Čistota kvašení byla též sledována mikroskopicky.

Výsledky

Laboratorní výtěžnostní pokusy

Výsledky výtěžnostních laboratorních pokusů uvádíme v tab. 1.

Tab. 1. Laboratorní výtěžnostní pokusy

Amylolytický preparát	Slad	*A. niger*	*A. oryzae*	*A. niger* a *A. oryzae*
Výtěžek (% teorie)	85,7	91,4	81,2	92,1

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Výtěžky, dosažené s preparáty *A. niger* nebo směsí preparátů *A. niger* a *A. oryzae*, jsou přibližně o 6 % vyšší než se sladem. Výtěžky, dosažené s preparátem *A. oryzae*, se přibližují výtěžkům se sladem.

Poloprovozní pokusy

Zcukřování bramborových zápar sladem. Množství zeleného sladu, použitého v pokuse, odpovídalo 15,9 % přítomného škrobu. Při vyhánění byla udržována v zapařovací kádi teplota 40 °C. Zcukřování trvalo při 49 °C jednu hodinu. Jodová zkouška, provedená po této době, ukázala dokonalé zcukření díla. Výsledky zapářky 1 a 2 jsou uvedeny v tabulkách 2, 3, 8, 9 a na obr. 1.

Tab. 2. Rozbor sladké zápary zcukřené sladem a průběh kvašení. Zapářka 1.

Doba kvašení v hod.	0	24	48	72
Sacharisace S°	17,25	8,25	3,65	2,90
Teplota °C	22	27	26	23
Titrační kyselost	0,2	0,32	0,6	0,95
pH	5,4	5,0	4,3	4,1
Redukující látky %	6,98	2,09	0,55	0,32

Tab. 3. Rozbor sladké zápary zcukřené sladem a průběh kvašení. Zapářka 2.

Doba kvašení v hod.	0	14	38	72
Sacharisace S°	15,90	12,80	3,55	2,4
Teplota °C	22	22	27	24
Titrační kyselost	0,20	0,28	0,57	0,92
pH	5,5	5,4	4,6	4,2
Redukující látky %	6,54	3,82	0,43	0,28

Jak je patrno z tabulek 2 a 3, činila sacharisace sladké zápary první zapářky 17,25 °S, druhé zapářky 15,9 °S. Průběh titrační kyselosti a zejména pH ukazuje dosti značný přírůstek kyselosti během kvašení, který však nepřekročil obvyklou hranici v běžném provozu. Tento přírůstek titrační kyselosti, jenž se též projevil poklesem pH pod hodnotu 4,5, byl způsoben mírnou kontaminací, která se však pohybovala v přípustných mezích. Tato okolnost způsobila, že byla po skončeném kvašení Ellrodtovou zkouškou zjištěna přítomnost jen malého množství účinné diastasy. Hodnoty redukujících látek (% glukosy) v 72. hodině kvašení a chromatogram z téže hodiny kvašení ukazují dokonalé vykvašení zkvasitelných cukrů. Na chromatogramech je též patrno, že nebyla zcela vykvašena maltotriosa a zbylo něco vyšších oligosacharidů. Nedostatečné prokvášení maltotriosy zřejmě souvisí s méně vhodnými vlastnostmi použitých kvasinek. V tabulce 8 jsou uvedeny rozbory výpalků. Také tyto hodnoty ukazují, že zcukření škrobu i prokvašení zápar proběhlo úspěšně.

Zcukřování bramborových zápar kombinací preparátů A. niger a A. oryzae. Postup při přípravě zapářky 3 a 4 se poněkud lišil. U třetí zapářky byla prvá část preparátu *A. oryzae* přidána na počátku vyhánění upařeného díla do kondensní vody při teplotě 55 °C. Během vyhánění byla teplota v zapařovací kádi udržována na 50 až 55 °C. Druhá část preparátu *A. oryzae* byla přidána po skončeném vyhánění a zápara byla ponechána 15 minut při teplotě 55 °C. Po této době byl přidán preparát *A. niger*. Jodová zkouška ukázala, že zcukření po této době (asi 20 minut od konce vyhánění) bylo již úplné. Kyselost byla upravena na pH 5 a zápara zchlazena na zákvasnou teplotu. Zápara vykazovala sacharisaci 16,4 °S a byla daleko tekutější než zápary připravené se sladem. Celkové množství použitých preparátů činilo 17,6 % váhy vneseného škrobu, z tohoto množství připadalo 8,8 % na preparát *A. oryzae* a 8,8 % na *A. niger*.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

U čtvrté zapářky byl postup týž (až do 15minutového prodlení při teplotě 55 °C) jen s tím rozdílem, že veškeré množství použitého preparátu *A. oryzae* bylo přidáno najednou na počátku vyhánění. Po 15minutovém prodlení byla teplota zvýšena na 65 °C, přidán preparát *A. niger* a pH zápary bylo upraveno přídavkem zředěné kyseliny sírové na hodnotu 4,5. Při uvedené teplotě bylo dílo zcukřováno 45 minut. Sacharisace zápary vykazovala hodnotu 15,3 °S; zápara byla daleko tekutější než zápary připravené se sladem. Celkové množství použitých preparátů činilo 11,3 % váhy škrobu, z čehož preparátu *A. oryzae* bylo 3,9 %. Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulkách 4, 5, 8, 9 a na obr. 2.

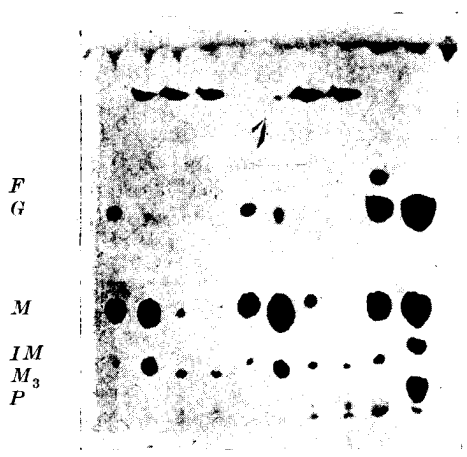
Tab. 4. Rozbor sladké zápary zcukřené směsí preparátů *A. oryzae* a *A. niger* a průběh kvašení. Zapářka 3.

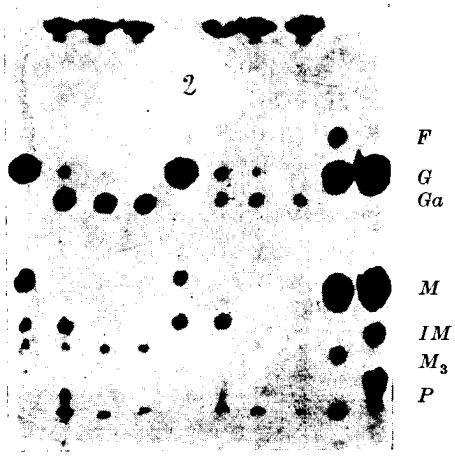
Doba kvašení v hod.	0	24	48	72
Sacharisace S°	16,4	4,4	1,7	1,7
Teplota °C	25	32	28	22
Titrační kyselost	0,50	0,70	0,80	0,92
pH	5,0	4,5	4,2	4,1
Redukující látky %	7,33	0,56	0,34	0,29

Tab. 5. Rozbor sladké zápary zcukřené směsí preparátů *A. oryzae* a *A. niger* a průběh kvašení. Zapářka 4.

Doba kvašení v hod.	0	14	38	72
Sacharisace S°	15,30	4,40	2,00	1,95
Teplota °C	25	28	27	20
Titrační kyselost	0,60	0,70	0,75	0,88
pH	4,5	4,3	4,1	4,0
Redukující látky %	7,07	0,55	0,35	0,43

Jak je patrno z hodnot získaných při sledování průběhu kvašení (tab. 4, 5) a z rozboru výpalků (tab. 8), proběhla hydrolysa škrobu a dextrinů lépe než při použití sladu. Pokles hodnoty pH byl proti sladu menší, i když pH kleslo též pod hodnotu 4,5. Mikroskopicky byl zjištěn jen ojedinělý výskyt kontaminujících mikroorganismů. Tyto výsledky též odůvodňují získání většího množství lihu, než tomu





Hod. 0 24 48 72 | 0 14 38 72 S_2 S_1 Hod. 0 24 48 72 | 0 14 38 72 S_2 S_1
Zapářka 1 | Zapářka 2 Zapářka 3 | Zapářka 4

Obr. 1. Chromatografické sledování vykvášení zápar zcukřených sladem.

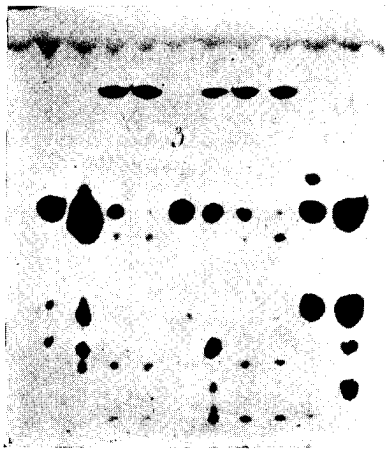
Obr. 2. Chromatografické sledování vykvášení zápar zcukřených směsí preparátů *A. niger* a *A. oryzae*.

F — fruktosa, *Ga* — galaktosa, *G* — glukosa, *M* — maltosa, M_3 — maltotriosa, *IM* — isomaltosa, *P* — panosa, S_1 — maltosa inkubovaná s preparátem *A. niger*, S_2 — sladina.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

bylo při použití sladu. Chromatogramy uvedené na obr. 2 vykazují známou tvorbu oligosacharidů s 1,6 — glukosidickou vazbou, isomaltosu a panosu, vzniklých transglukosidační činností. Je patrné, že tyto oligosacharidy byly během kvašení hydrolysovány. Výskyt maltotriosy lze vysvětlit obdobně, jako tomu bylo u zápar, zcukřených sladem.



Hod. 0 24 48 72 | 0 14 38 72 S_2 S_1
Zapářka 5 | Zapářka 6

F — fruktosa, *Ga* — galaktosa, *G* — glukosa, *M* — maltosa, M_3 — maltotriosa, *IM* — isomaltosa, *P* — panosa, S_1 — maltosa inkubovaná s preparátem *A. niger*, S_2 — sladina.

Obr. 3. Chromatografické sledování vykvášení zápar zcukřených preparátem *A. niger*.

Kromě již známých cukrů, které vznikají při hydrolyse škrobu enzymatickým působením plísňových preparátů, vznikly při kvašení činností těchto preparátů ještě další cukry. Skvrny v čele chromatogramu jsou pravděpodobně pentosy a galakturonové kyseliny. Zajímavým nálezem je objevení se galaktosy po prvém dnu kvašení, která není v tomto případě zkvašována.

Zcukřování bramborových zápar preparátem A. niger. Preparát *A. niger* byl přidáván k upařenému dílu na dvakrát: prvá část preparátu na začátku vyhánění do kondensní vody a druhá na konci vyhánění. Během vyhánění byla v zapařovací kádi udržována teplota 60 °C. Po skončeném vyhánění byla teplota upravena na 65 °C a pH na hodnotu 5. Při této teplotě bylo dílo zcukřováno jednu hodinu. Zápara se zbarvila při zkoušce jodovým roztokem slabě růžově.

U zapářky 5 bylo použito 14,3 % preparátu váhy škrobu a sacharisace zápary činila 15,6 °S, u šesté zapářky 11,7 % a sacharisace byla 16,2 °S. Ztekucení obou zápar bylo normální. Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulkách 6, 7, 8, 9 a na obr. 3.

Hodnoty uvedené v tabulkách ukazují, že hydrolysa škrobu a dextrinů proběhla dokonale. Totéž potvrzují chromatogramy (obr. 3), na nichž je též patrné malé množství vzniklé galaktosy. Mikroskopicky bylo zjištěno, že kvašení proběhlo zcela čistě, nepozorovali jsme výskyt cizích mikroorganismů. Ellrodtova zkouška, prove-

Tab. 6. Rozbor sladké zápary zcukřené preparátem *A. niger* a průběh kvašení. Zapářka 5.

Doba kvašení v hod.	0	24	48	72
Sacharisace S°	15,6	6,3	2,3	1,75
Teplota °C	22	26	26	23
Titrační kyselost	0,50	0,58	0,62	0,79
pH	5,1	4,6	4,5	4,2
Redukující látky %	6,83	1,25	0,34	0,28

Tab. 7. Rozbor sladké zápary zcukřené preparátem *A. niger* a průběh kvašení. Zapářka 6.

Doba kvašení v hod.	0	14	38	72
Sacharisace S°	16,20	7,30	2,10	1,65
Teplota °C	22	27	26	22
Titrační kyselost	0,60	0,66	0,71	0,74
pH	5,0	4,6	4,4	4,2
Redukující látky %	5,01	1,13	0,37	0,43

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

dená ve zralé zápaře, ukázala přítomnost ještě velkého přebytku aktivního enzymatického systému štěpícího škrob. Tyto okolnosti se příznivě projevily v množství získaného lihu, které je větší než při použití směsi obou plísňových preparátů.

Tab. 8. Rozbor výpalků

	Slad		*A. niger* a *A. oryzae*		*A. niger*	
	zapářka 1	zapářka 2	zapářka 3	zapářka 4	zapářka 5	zapářka 6
Titrační kyselost	0,5	0,48	0,75	0,6	0,55	0,50
Sacharisace	4,2	4,3	3,9	3,5	3,3	3,5
Alkohol %	0,08	0,07	0,03	0,05	0,07	0,08
Alkohol po novém zakvašení %	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
Alkohol po hydrolyse %	0,17	0,19	0,10	0,10	0,07	0,09

Tab. 9. Množství vyrobeného alkoholu

	Slad		*A. niger* a *A. oryzae*		*A. niger*	
	zapářka 1	zapářka 2	zapářka 3	zapářka 4	zapářka 5	zapářka 6
Litrů absolutního alkoholu	13,99	14,42	15,73	15,03	16,67	16,66

Tab. 10. Rozbor získaného surového lihu

	Slad		*A. niger* a *A. oryzae*		*A. niger*
	zapářka 1	zapářka 2	zapářka 3	zapářka 4	zapářka 6
Alkohol % obj.	56,52	64,34	65,92	48,06	64,46
Aldehydy jako acetaldehyd mg v litru absol. alkoholu	265	241	380	480	387
Přiboudlina mg v litru absol. alkoholu	1190	1160	1910	1350	1363
Fural	reakce	reakce	reakce silně positivní		reakce positivní
Volné kyseliny jako kys. octová mg v litru absol. alkoholu	85,0	93,3	72,9	100	93
Estery jako octan ethylnatý, mg v litru absol. alkoholu	1340	1108	2400	1560	973
Methanol	sledy	sledy	reakce ve stopách		dtto

Jakost získaného lihu. V tabulce 10 jsou uvedeny rozbory získaného lihu, které byly provedeny ve Zkušebním a kontrolním ústavu potravinářského průmyslu v Praze. Z jednotlivých stanovení je patrné, že surový líh, získaný ze zápar zcukřených plísňovými preparáty, má téměř totéž složení jako surový líh ze zápar zcukřených sladem. Degustačně byl však líh, získaný pomocí plísňových preparátů, lepší.

Diskuse

Jedním z technologických problémů při zcukřování škrobnatých surovin a zejména díla z brambor je rychlé ztekucení díla při vyhánění a v prvých fázích zcukřování. Od určité doby se traduje v literatuře zpráva Waldschmidt-Leitzova a Mayerova (1935) o účinku speciálního enzymu, který se účastní na ztekucování škrobu, t. zv. amylofosfatásy. Tento enzym, isolovaný autory z ječného sladu, ztekucoval škrob za uvolnění H_3PO_4. Existence tohoto enzymu však nebyla potvrzena (Redfern 1950). Novější práce naopak dokazují, že H_3PO_4 se uvolňuje v pozdějších stadiích zcukření (Klimovskij a Rodzevič 1949)

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

a hlubší poznání mechanismu hydrolysy škrobu sladovou diastásou dokazuje, že škrob ztekucuje pouze anebo převážně α-amylása (Redfern 1950). Počáteční činností α-amylásy je velmi rychlé ztekucení škrobu, způsobené hydrolysou 1,4-glukosidických vazeb, umístěných více ke středu řetězce škrobové molekuly. Hollenbeck a Blisch (1941) stanovili, že při úplném ztekucení škrobu je zhydrolysováno pouze 0,5 % celkových glukosidických vazeb. Následující dextrinace a zcukření α-amylásou jde pomaleji. Ještě při dosažení achroického bodu při hydrolyse škrobu α-amylásou je rozštěpeno pouze 10 % 1,4-glukosidických vazeb (Hollenbeck a Blisch 1941). Tato fakta byla též ověřena na plísňových preparátech. Plísňová α-amylása má obdobné vlastnosti α-amylás jiných preparátů a je zapotřebí jen malého množství tohoto enzymu pro úplné ztekucení obilných zápar. Plísňové preparáty, které obsahují málo nebo žádnou α-amylásu, dávají husté, gumovité zápary (Corman a Langlykke 1948).

Je známo, že hlavním enzymatickým systémem, štěpícím škrob u preparátu *A. oryzae*, je α-amylása. Pro činnost tohoto enzymu je charakteristické množství vytvořených jednotlivých zkvasitelných cukrů a jiných fragmentů škrobu, a to: malého množství glukosy, více maltosy a značně maltotriosy, maltotetraosy a vyšších dextrinů, tak jak to též bylo již dříve uvedeno při chromatografických studiích (Burger a Beran 1956b, Stárka 1954, 1955). Význačným enzymatickým systémem preparátu *A. niger* je maltása. Tento enzymatický systém v nepřítomnosti α-amylásy též hydrolysuje celou škrobovou molekulu, ale zcela jiným mechanismem. Odštěpuje glukosu z konců řetězce škrobové molekuly (Burger a Beran 1956a). Proto je také v tomto případě ztekucení obtížnější a dodržení optimálních podmínek pro činnost maltásy důležitější (Beran a Burger 1956). Z našich pokusů je to též patrné ze zbarvení zápary jodovým roztokem. Achroický bod při použití preparátu *A. niger* se dostavuje později a neúplněji, než je tomu se směsí preparátů *A. niger* a *A. oryzae*. Způsob hydrolysy škrobu preparátem *A. niger* je též patrný z rozložení cukrů na chromatogramech: vzniká značné množství glukosy, malé množství maltosy a nepatrné množství maltotriosy a vyšších oligosacharidů, nehledíme-li k oligosacharidům s 1,6 - glukosidickou vazbou. Naše výsledky dokazují, že též při zcukřování koncentrovaných bramborových zápar je možno dosáhnout dostatečné tekutosti pomocí preparátu *A. niger*, je-li přítomna dostatečně aktivní maltása (glukogenický systém) a dodržují-li se optimální podmínky pro její činnost.

Pravděpodobně malá maltásová aktivita preparátu *A. niger*, který nemá dostatek α-amylásy, a dosavadní neznalost optimálních podmínek pro hydrolysu škrobu maltásou *A. niger*, nebo obojí, vedly některé autory k závěru, že pro zcukřování bramborových zápar nelze použít samotného preparátu *A. niger* a že je nutno hlavně z důvodů dobrého ztekucení použít též přídavku sladu (Malcher 1954). Práce, sledující možnost získání preparátu *A. niger* s největší aktivitou maltásy, nebyly ještě provedeny. Též při přípravě preparátů, použitých v této práci, se projevila značná proměnlivost v enzymatických aktivitách jednotlivých šarží vyrobených preparátů. Sledování tohoto cíle může ještě dále ovlivnit ekonomii zcukřování škrobnatých surovin preparátem *A. niger*.

K dosažení maximálních výtěžků lihu je důležité, aby též dextriny, vzniklé při procesu zcukření, byly zcela zhydrolysovány ve zkvasitelné cukry. Významnou úlohu při tom hraje štěpení α-D-1,6-glukosidických vazeb, vyskytujících se v t. zv. hraničních dextrinech (Redfern 1950). Enzymy, štěpící tyto anomální vazby, byly zjištěny v různých amylolytických preparátech, též ve sladu a v plísních. Ve sladu je jejich obsah velmi proměnlivý (Myrbäck a Ahlborg 1942). Již dříve bylo dokázáno, že použitý preparát *A. niger* nejen silně tvoří nezkvasitelné oligosacharidy s α-D-1,6-glukosidickou vazbou, ale též tyto vazby intensivně štěpí (Burger a Beran 1954).

Vyšší výtěžky lihu, dosažené různými autory a též v této práci plísňovými preparáty ve srovnání se sladem, lze vysvětlit též větší pestrostí a v některých případech i množstvím enzymatických systémů v plísňových preparátech přítomných, štěpících jiné uhlohydráty než škrob. U plísně *A. niger* je známa přítomnost také velmi aktivních celulás, β-glukosidás (Burger a Beran 1956b), polygalakturosidás a galakturosidás. Jak je patrno z chromatogramu (obr. 2), vyznačuje se použitý preparát

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

A. oryzae silně aktivní galaktosidásou. Tyto enzymatické činnosti se mohou též příznivě projevit ve výtěžku lihu; jak je patrno v případě výskytu galaktosy, výtěžky se dají vhodným kvasničným kmenem ještě dále ovlivnit. Je zajímavé, že preparát *A. oryzae* se vyznačuje jen nepatrnou činností α-D-glukosidás, avšak značnou aktivitou galaktosidás.

Provedenými poloprovozními pokusy jsme nesledovali otázku dosažení maximálních výtěžků, ale za týchž podmínek jsme srovnávali použití plísňových preparátů a sladu pro zcukřování bramborových zápar. Výtěžky jsou pochopitelně zatíženy ztrátami poloprovozu, které jsou na užitém zařízení vyšší než v provozu, a nebyly též korigovány na množství odebraných vzorků; ty činily asi 3 % objemu zápary. Též výtěžky, uváděné u pokusů se směsí preparátu *A. niger* a *A. oryzae*, jsou ještě zatíženy jinými ztrátami, které vznikly z určitých technických nedostatků, avšak přesto jsou tyto výtěžky ještě vyšší, než výtěžky dosažené se sladem. Z technických důvodů jsme nemohli použít déle vedeného lihovarského sladu. Analysy výpalků však dokázaly, že i tímto sladem proběhlo zcukření dobře. Nepřítomnost dextrinační mohutnosti ve zralé sladové zápaře, zjištěnou Ellrodtovou zkouškou, je možno proto vysvětlit malou stabilitou α-amylásy při nízkém pH, způsobeném kontaminací.

Jak je patrno z chromatogramů (obr. 1, 2, 3), výtěžky je možno ještě dále zvýšit použitím vhodnějšího kmene kvasinek, zejména vykvášejících maltotriosu a pravděpodobně méně citlivých k alkoholu. Jak je patrno na chromatogramu (obr. 3), zůstávají ve zralých záparách stopy glukosy. To též dokazuje nutnost hledat a zavést vhodné lihovarské rasy kvasinek v našich zemědělských lihovarech. Abychom dodrželi jednotný postup v poloprovozních pokusech, museli jsme použít pekařského droždí (násadní generace), ač víme, že není mikrobiologicky zcela čisté a pro zkvašování maltosových zápar se dobře nehodí, neboť nechává větší nedokvasy a spotřebuje větší množství cukru k stavbě buněčné hmoty než pravé lihovarské maltosové kvasinky, na př. R XII (Zelenka 1942).

S technologického hlediska skýtá použití preparátu *A. niger* ještě další výhody, které se projevují ve vyšších výtěžcích lihu. Relativně vysoká teplota při zcukřování (65 °C) a možnost použití nižšího pH již při zcukření (4,5 až 5) dává příznivé podmínky pro přípravu mikrobiologicky čistých zápar. Též pH kolem 4,5 se příznivě projevuje při kvašení. Přitom není hydrolytická aktivita preparátu nijak nepříznivě ovlivněna. Ellrodtova zkouška dokazuje přítomnost značného množství účinné „diastasy" ještě ve zralých záparách.

Pro technologii je též zajímavý rychlejší průběh kvašení. Jakost surového lihu při použití plísňových preparátů k zcukřování bramborových zápar je přibližně táž, jako při použití sladu. Avšak vzhledem k tomu, že surový líh, získaný pomocí plísňových preparátů, je chuťově lepší, je možné, že skladba přiboudliny je jiná než při použití sladu.

Souhrn

Provedli jsme poloprovozní pokusy se zcukřováním bramborových zápar plísňovými preparáty za podmínek dříve laboratorně prostudovaných a zjistili jsme toto:

1. Zcukřování bramborových zápar kombinací preparátů *A. niger* a *A. oryzae* i samotným preparátem *A. niger* probíhá bez technologických potíží a při přípravě zápar není nutno přidávat slad.

2. Zápary, zcukřené kombinací preparátů *A. niger* a *A. oryzae*, jsou tekutější než zápary, zcukřené sladem. Při použití preparátu *A. niger* mají normální tekutost.

3. Výtěžky lihu ze zápar, zcukřených plísňovými preparáty, jsou větší než ze zápar, zcukřených sladem, a ještě se zvýší použitím vhodných ras kvasinek. Jakost získaného surového lihu je stejná jako při použití plísní i sladu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

4. Při užití preparátu *A. niger* zabraňuje vyšší zcukřovací teplota (65 °C) a nižší pH (4,5 až 5,0) kontaminaci, a to jak při zcukřování, tak i vzhledem k pH při kvašení.

5. Prokvášení zápar, připravených plísňovými preparáty, je rychlejší.

6. Zcukřovací činností preparátu *A. oryzae* se při kvašení uvolňuje galaktosa.

Literatura

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

Beran, K., Burger, M.: *Studium optimálních podmínek pro zcukřování bramborových zápar plísňovými enzymatickými preparáty.* Čs. mikrobiol. 1 : 97, 1956.

Burger, M., Beran, K.: *K otázce mechanismu hydrolysy dextrinů plísňovými enzymatickými preparáty.* Chem. listy 48 : 1395, 1954.

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

Burger, M., Beran, K.: *O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu plísně Aspergillius niger.* Čs. mikrobiol. 1 : 26, 1956b.

Corman, J., Langlykke, A. F.: *Action of mold enzymes in starch saccharification.* Cereal. Chem. 25 : 190, 1948.

Erb, N. M., Hildebrandt, F. M.: *Mold as an adjuct to malt in grain fermentation.* Ind. Eng. Chem. 38 : 792, 1946.

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

Hollenbeck, C. M., Blish, M. J.: *Parallelism between starch dextrinizing and liquefying activities of amylases.* Cereal Chem. 18 : 754, 1941.

Klimovskij, D. N., Rodzevič, V. Z.: *Gidroliz krachmala pri dejstviji amilazy rozličnovo proizchoždenija.* Biochimija 14 : 26, 1949.

Kleinzeller, A., Lacko, L.: *Tvorba amylolytických enzymů v Aspergillus niger a Aspergillus oryzae.* Chem. listy 46 : 679, 1952.

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

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

Malcher, J.: Sdělení na konferenci technické mikrobiologie, Praha 1954.

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

Myrbäck, K., Ahlborg, K.: *Über Grenzdextrine und Stärke. XIV. Spezifität der Amylasen und Produkte ihrer Wirkung.* Biochem. Z. 311 : 213, 1942.

Pan, S. C., Andreasen, A. A., Kolachov, P.: *Rate of secondary fermentation of corn mashes converted by A. niger.* Ind. Eng. Chem. 42 : 1783, 1950.

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

Redfern, S.: *Recent developments in amylase chemistry.* Wallerstein Lab. Comm. 13, 41 : 89, 1950.

Sova, Vl.: *Náhrada obilních lihovarských sladů amylolytickými preparáty plísňovými.* Průmysl výživy 1 : 261, 1950.

Sova, Vl.: *Amylásy, jejich účinek a použití.* Průmysl potravin 4 : 151, 1953.

Schoorl, N., Regenbogen, A.: *Massanalytische Zuckerbestimmung.* Z. anal. Chem. 56 : 191, 1917.

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

Sotničenko, L. P.: *O častičnoj zamene zernovovo soloda plesnevymi gribami.* Spirt. promyšlenost 1 : 39, 1955.

Stárka, J.: *Příprava plísňových amylolytických preparátů na pšeničných otrubách.* Průmysl potravin 3 : 488, 1952.

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

Stárka, J.: *Dynamika hydrolysy škrobu amylasami Aspergillus niger a Aspergillus oryzae.* Preslia 27 : 155, 1955.

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

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

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Underkofler, L. A., Fulmer, E. I., Schwene, L.: *Saccharification of starchy grain mashes for the alcoholic fermentation industry.* Ind. Eng. Chem. 31 : 734, 1939.
Underkofler, L. A., Swenson, G. M., Goering, K. J.: *Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. Plant scale use of mold amylase.* Ind. Eng. Chem. 38 : 980, 1946.
Waldschmid-Leitz, E., Mayer, K.: *Enzymatische Amylolyse. V. Amylophosphatase aus Gerste.* Z. physiol. Chem. 236 : 168, 1935.
Zelenka, St. starší: *Aseptický lihovarský zákvas Amylo.* Zemědělský průmysl. Odborná příloha Čs. zemědělce. 49, 1923.
Zelenka, St.: *Výběr kvasných odrůd pro kvasný průmysl.* Sborník prací Výzkumného ústavu bramborářského. Havlíčkův Brod 1942.

Новые данные, полученные при использовании грибковых амилолитических препаратов для сахарификации картофельных заторов

Полупроизводственные опыты с грибковыми препаратами при выработке спирта из картофеля

К. Беран, М. Бургер и С. Зеленка

Резюме

Были поставлены полупроизводственные опыты сахарификации картофельных заторов препаратами грибков в условиях, изученных предварительно в лаборатории (Беран и Бургер 1956). Установлено, что: сахарификация картофельных запар комбинацией препаратов A. niger и A. oryzae или одним только препаратом A. niger протекает без технологических осложнений и что для приготовления затора нет необходимости в прибавлении солода. При использовании комбинации препаратов A. niger и A. oryzae заторы оказываются более жидкими, чем при использовании солода. При использовании препарата A. niger степень разжижения остается нормальной. Выход спирта при сахарификации с помощью грибковых препаратов бывает больше, чем при сахарификации солодом, и еще увеличивается при условии применения соответственных рас дрожжей. При применении препарата A. niger повышение температуры сахарификации (65 °C) и понижение pH (4,5—5,0) препятствует размножению инфекции не только при сахарификации, но и (что касается pH) при сбраживании. Сбраживание затора с грибковыми препаратами протекает быстрее. Качество получаемого сырого спирта такое же, как и с применением грибков и солода. Благодаря сахарифицирующей деятельности A. oryzae при брожении выделяется галактоза.

New Findings in the Use of Amylolytic Preparations of Fungi for Saccharification of Starch in Potato Mash

Semi-pilot Plant Experiments with Fungus Preparations in the Production of Alcohol from Potatos

K. Beran, M. Burger and S. Zelenka

Summary

Semi-pilot plant experiments were carried out with saccharification of potato mash using fungus preparations, which had previously been carried out under laboratory conditions (Beran and Burger 1956). The following findings were made: The saccharification of the starch in potato mash with a combination of preparations of A. niger and A. oryzae and with a preparation of A. niger alone presents no technological difficulties and there is no need to add malt when preparing the mash. Mash saccharified with a combination of preparations of A. niger and A. oryzae is more fluid than mash saccharified with malt. On using a preparation of A. niger the consistency of the mash is normal. The yield of alcohol from mash saccharified with preparations of fungi is greater than from mash saccharified with malt and is increased still further on using suitable strains of yeast. On using a preparation of A. niger, the higher temperature of conversion into sugar (65° C) and the lower pH (4.5 – 5.0) prevents the spread of infections, both in respect of the sugaring process and also, as regards the pH, in fermentation. Fermentation of mash prepared with fungous preparations is more rapid. The quality of alcohol obtained in this way is the same as on using fungi and malt. The action of a preparation of A. oryzae results in galactose being freed during fermentation.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 5

Selektivní inhibice drsných forem kvasinek

LUDMILA ŠILHÁNKOVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická, biologická katedra, Praha

Došlo 20. 3. 1956

Již Hansen (1895) a Lepeškin (1903) pozorovali, že ssedlinotvorné druhy kvasinek často tvoří značně protáhlé buňky, přecházející v pseudomycelium až pravé mycelium. Změna tvaru buněk je doprovázena tvorbou křísu na tekutém substrátě a změnou kolonií z hladkého lesklého typu v typ drsný, až zvrásněný, široce se rozrůstající.

Jako příčinu tohoto zjevu udávají autoři nejrůznější okolnosti, jak ve svém přehledu uvádějí Scherr a Weaver (1953). Na obdobu této přeměny kvasinek s dissociací bakterií v R a S formy poukázali po prvé Fabian a McCullough (1934), kteří různými činidly indukovali tvorbu drsných forem u 3 kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. Zpětné přeměny drsné formy v hladkou dosáhli mnohonásobným převáděním na tekutou sladinku a inkubací po 24 hodin při optimální teplotě. Mickle a Jones (1940) potvrdili tyto výsledky u 18 kmenů *Candida albicans* a zjistili, že získané R formy odpovídají R formám bakterií i pokud jde o patogenitu. Redaelli a sp. (1939) přeměňovali vzájemně R a S formy kvasinek pomocí hypotonických, isotonických a hypertonických roztoků sacharosy, jestliže v kultuře byla každá forma zastoupena alespoň 1 buňkou. Leopold a sp. (1954) zjistili tvorbu drsných myceliálních forem u *Candida utilis* při udržování na agaru z louhů po citronovém kvašení.

Brodie (1948) a Brodie a Shephard (1949) pozorovali, že drsné kmeny bakterií jsou inhibovány žlučovými kyselinami v roztocích s elektrolyty (na př. s 0,2 M citrátem sodným), zatím co hladké nikoliv, čehož lze použít k isolaci hladkých kmenů. Podle těchto autorů závisí synergické působení žlučanů a elektrolytů také na aerobiose a na povaze povrchu, na kterém růst nastává. Selektivní inhibici drsných forem dokázali na agaru, silikagelu nebo v nízkých vrstvách kapaliny. Na želatině a ve vysokých vrstvách kapaliny selektivní inhibice selhala. U želatiny to vysvětlují jejím „suchým" povrchem, proti povrchu agaru ovlhčenému kondensační vodou. Elektronovým mikroskopem zjistili, že žlučové kyseliny zvyšují permeabilitu buněčné blány a tím usnadňují vstup elektrolytů do buňky, neboť po přenesení do destilované vody buňky bobtnaly a praskaly za vyhřeznutí protoplasmy.

Chtěli jsme zjistit, zda selektivní inhibice drsných forem solemi žlučových kyselin platí i pro kvasinky a zda by se tohoto úkazu dalo prakticky použít k získání původních hladkých forem z dissociovaných kultur. Drsné formy totiž svým rychlejším a široce se rozprostírajícím růstem potlačují formy hladké, jejichž isolace je pak velmi obtížná. Přitom však jsou drsné formy nežádoucí v lihovarské praxi pro svou slabší kvasivost a v drožďařské pro potíže, které způsobují na odstředivkách (Řach 1956).

Materiál a metody

Použité kvasinky. Pracovali jsme s kvasinkou *Saccharomyces fragilis*, lihovarskou kvasinkou a 2 vinařskými kvasinkami (Malaga, Sherry), u nichž nastala částečná přeměna v drsné formy (obr. 1, 2, 3). Nejpokročilejší byla tato přeměna u *S. fragilis*. Čisté drsné formy byly isolovány opakovanou zřeďovací metodou a formy hladké z 0,08 M koncentrace cholátu sodného a dalším pasážováním na sladinkovém agaru. Obě tyto formy se shodovaly v testovacích zkouškách, jen s tím rozdílem, že drsná forma zkvašovala cukry slaběji než forma hladká. Pro kontrolu jsme pracovali též s kvasinkami křísotvornými

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

(Hansenula anomala, 2 kmeny *Pichia membranaefaciens, Hansenula schneggii)*. Používané kultury byly před každým pokusem dvakrát pasážovány po 48 hodin na sladince.

Živné prostředí a kultivační technika. Jako živného prostředí jsme použili sladinky o koncentraci 8 °Bg a pH 5,5 až 5,8, případně ztužené 2 % agaru. Po přidání agaru a sterilisaci bylo pH znovu upravováno. Použitý cholát sodný jsme připravili rozpuštěním kyseliny cholové (l. č.) v ekvivalentním množství 1 n NaOH a sterilisovali 20 minut při přetlaku 1,5 atm. Roztok cholátu jsme pipetovali do Petriho misek a přelili přesným objemem rozehřátého sladinkového agaru. Po rozmíchání a utuhnutí jsme na desky čárkovali z tekuté sladinky zřeďovací isolační metodou dissociovanou kulturu kvasinek, nebo každou formu zvlášť. Inkubační teplota byla 29,5 až 30,5 °C, u želatinových půd 19 až 22 °C. Růst kolonií jsme sledovali ve 24hodinových intervalech.

Předběžnými pokusy jsme zjistili, že v přítomnosti citranu sodného dochází na sladinkovém agaru k částečné až úplné inhibici drsných i hladkých forem kvasinek, a proto jsme na rozdíl od prací Brodieho (1948) i Brodieho a Shepharda (1949) pracovali s různými koncentracemi cholátu sodného bez přídavku elektrolytů.

Počítání živých buněk se dálo deskovou metodou, při čemž byla kultura naředěna tak, aby na desce narostlo 50—200 kolonií. U drsných forem byla suspense kvasinek pipetována na utuhlou desku sladinkového agaru, v ostatních případech byla pipetovaná kultura přelita v Petriho misce rozehřátým sladinkovým agarem, ochlazeným na 40 °C. U drsných forem byl takto zjištěný počet zárodků nižší než faktický stav, neboť buňky tvoří svazky nebo řetízky pseudomyceliovité povahy, jež se dají velmi těžko rozdělit.

Výsledky

Inhibice růstu drsných forem kvasinek na ztužené sladince

Na sladinkovém agaru s cholátem sodným nastala úplná inhibice drsných forem s protáhlými buňkami při koncentraci 0,008 až 0,015 M cholátu, zatím co hladké formy rostly ještě při koncentraci 0,120 M, jak je patrno z tabulky 1. Hladké kolonie, vyrůstající při koncentraci 0,12 M cholátu sodného, byly z počátku téměř

Tab. 1. Vliv cholátu sodného na růst drsných a hladkých forem kvasinek na SA

	S. fragilis		Lihovar. kvasinka		Malaga		Sherry	
Koncentr. cholátu sod. (M)	drsná forma	hladká forma	drsná forma	hladká forma	drsná forma	hladká forma	drsná forma	hladká forma
0	++++	—	++++	+	+++	+	+++	+
0,004	+++	+	++	++	+++	++	++	+
0,008	—	++	—	++++	+	+++	+	++
0,015	—	++	—	+++	—	+++	—	+++
0,030	—	+	—	+++	—	+++	—	+++
0,060	—	+	—	+++	—	+++	—	+++
0,120	—	+	—	+++	—	+++	—	+++

Pracováno s dissociovanými kulturami, dvakrát pasážovanými na sladince po 48 hodin. Očkováno čárkováním na sladinkový agar isolační metodou. Inkubace 72 hod. při 30 °C. V nepřítomnosti cholátu sodného a při jeho malé koncentraci (0,004 M) je hladká forma potlačena silně se rozvíjející formou drsnou. Hodnocení růstu: ++++ velmi dobrý růst po celé délce nátěru; +++ růst je poněkud zpomalen; ++ vyskytují se jen isolované kolonie; + přítomno jen několik kolonií; — růst nenastává.

průsvitné, velmi lesklé, jakoby vlhké, měkké až slizovité konsistence. Mikroskopicky se však buňky příliš nelišily od kontroly, snad jedině kulovitějším tvarem a častým, téměř současným, multipolárním pučením. Hladké formy z koncentrace 0,008, 0,06 a 0,12 M cholátu byly převedeny na sladinkový agar a sladinku a podržely si svůj charakter ve všech dalších pasážích (byly pasážovány sedmkrát, vždy po 2—3 dnech).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

U některých přechodných (SR) forem lihovarské kvasinky, hlavně po několikerém přeočkování na tekuté sladince, nastal při 0,015 M koncentraci cholátu sodného růst v podobě průhledných, lesklých kolonií, mnohem menších než normální hladké kolonie. Po mikroskopické stránce buňky nezměnily svůj tvar, byly stále protáhlé a po přeočkování na sladinkový agar poskytly kolonie obdobné původním, t. j. suché, jemně zvrásněné, moučného vzhledu.

Na normální křísotvorné kvasinky ve zkoušených koncentracích (t. j. do 0,12 M) cholát sodný nepůsobil inhibičně, avšak při vyšších koncentracích dostaly kolonie lesklý, vlhký charakter (obr. 11, 12). Po přeočkování těchto lesklých kolonií na sladinkový agar se však již v první pasáži vytvořily normální suché, drsné kolonie.

Abychom mohli kvantitativně sledovat inhibiční vliv cholátu sodného na hladké formy kvasinek na sladinkovém agaru, pěstovali jsme na deskách suspensi hladkých forem o známém počtu buněk a vyrostlé kolonie počítali. Bylo zjištěno, že ani ty koncentrace cholátu, jež úplně inhibují drsné formy, nesnižují počet kolonií forem hladkých. Zpomalují pouze rozmnožování buněk, což je zřetelné z velikosti kolonií (tabulka 2).

Tab. 2. Vliv cholátu sodného na velikost kolonií hladkých forem kvasinek na sladinkovém agaru

Koncentr. cholátu (M)	Průměr kolonií lihov. kvas. (mm)		Průměr kolonií *S. fragilis* (mm)	
	povrchové	v substrátu	povrchové	v substrátu
0	2,5—2,8	3,0—4,0	1,0—1,2	1,5—2,0
0,008	1,8	2,0—2,7	0,8	1,2—1,5
0,30	1,0	1,5—1,7	0,3	0,5
0,12	—	0,5—0,7	—	—

0,2 a 0,5 ml 48 hod. staré suspense hladkých forem obsahující 185 buněk (u lihovarské kvasinky) a 230 buněk (u *S. fragilis*) v ml bylo pipetováno do Petriho misek a přelito sladinkovým agarem. Inkubace 42 hod. při 30 °C.

Na sladinkové želatině v přítomnosti cholátu sodného docházelo k různým výsledkům. Někdy selektivní inhibice drsných forem nenastala a z dissociované kultury vyrostl za všech koncentrací cholátu sodného jeden typ kolonií suchého, drsného povrchu s jemným vrásněním, jakýsi přechod mezi hladkými a drsnými koloniemi, pravděpodobně způsobený směsí obou forem. Někdy inhibice drsných forem nastala, avšak při značně vyšších koncentracích cholátu sodného. Jelikož probíhala kultivace na sladinkové želatině při 19—22 °C, byl proveden pokus se sladinkovým agarem za týchž podmínek. U sladinkového agaru selektivní inhibice drsných forem nastala i při této teplotě a shodovala se s výsledky při teplotě 30 °C.

Vliv cholátu sodného v kapalném prostředí

Pokusy na tekuté sladince jsme konali s hladkými a drsnými formami zvlášť. Každou z těchto forem jsme očkem přenesli z tekuté sladinky do příslušné koncentrace cholátu sodného v 10 ml sladinky ve zkumavkách. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3, z níž je patrno, že i ve vysoké vrstvě kapaliny nastává selektivní inhibice drsných forem.

Při kvantitavním sledování vlivu cholátu sodného na drsné formy ve vysoké vrstvě kapaliny jsme zkumavky s 10 ml, substrátu zaočkovali 48 hod. starou kulturou tak, aby obsahovaly 10^4 buněk/ml, a po 24 hodinách inkubace jsme stanovili počet zárodků kultivační metodou polevu na desky. Po 24 hodinách inkubace klesl počet

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

živých buněk u koncentrací 0,015 M a 0,12 M z původních 10.300/ml na nulu. Mikroskopicky jsme zjistili, že četné buňky mají poškozenou blánu, takže se z nich protoplasma uvolňuje ve formě zrníček. Stav buněk po 20 hodinách inkubace je patrný z obr. 9 a 10. Buňky byly v tomto případě kultivovány na čiré sladince, takže přítomná zrníčka nemohou být koaguláty bílkovin ze sladinky. U hladkých forem k rozrušení buněčné blány za zkoušených koncentrací nedochází.

Tab. 3. Vliv cholátu sodného na růst kvasinek ve vysoké vrstvě sladinky

Koncentr. cholátu (M)	Hladká forma				Drsná forma			
	po 16 hod.		po 48 hod.		po 16 hod.		po 48 hod.	
	blanka	ssedlina	blanka	ssedlina	blanka	ssedlina	blanka	ssedlina
0	–	++	–	+++	+	–	++++	–
0,004	–	++	–	+++	+	–	+++	–
0,008	–	++	–	+++	+	–	++	–
0,015	–	+	–	++	–	–	–	–
0,030	–	+	–	++	–	–	–	–
0,060	–	–	–	+	–	–	–	–

Očko ze 48 hodin staré suspense kvasinek přeneseno do 10 ml substrátu ve zkumavce a inkubováno při 30 °C. Pracováno s lihovarskou kvasinkou a *S. fragilis*.

Při sledování účinku cholátu sodného v nízkých vrstvách kapaliny jsme postupovali stejným způsobem, avšak substrát (10 ml) byl umístěn v Erlenmeyerově baňce o obsahu 300 ml. U drsných forem klesl počet živých buněk při koncentraci 0,12 M po 24 hodinách z původních 60.000/ml na 1800/ml, t. j. o 97 %. Z původních 10.000 buněk v ml klesl při téže koncentraci počet živých buněk po 24 hodinách na nulu. U koncentrace 0,015 M cholátu sodného, jež bezpečně inhibovala růst drsných forem na sladinkovém agaru i ve vysoké vrstvě kapaliny, došlo k poklesu živých buněk drsné formy z původních 10.000 v 1 ml na 45, což je o 99,5 %. Z uvedených výsledků je zřejmé, že působení cholátu sodného na drsné formy je fungicidní povahy a že jeho účinek závisí též na koncentraci buněk v substrátu.

Tabulka 4.
Vliv výšky substrátu a anaerobních podmínek na působení cholátu sodného na drsné formy kvasinek

Koncentr. cholátu (M)	Počet buněk v 1 ml v 0 hod.	Počet buněk v 1 ml po 24 hod.			
		ve vysoké vrstvě (ve zkumavce)	v nízké vrstvě (1 ml/30 cm²)		
			aerobně	v dusíku	pod parafinem
0	10 300	$3{,}2 \cdot 10^8$	$2{,}0 \cdot 10^9$	$2{,}8 \cdot 10^6$	$7{,}0 \cdot 10^7$
0,015	10 300	0	7	0	0
0,12	10 300	0	1	0	1

Pracováno s drsnou formou *S. fragilis*, s 24 hod. starou suspensí.
Udaná čísla jsou průměrem výsledků dvou pokusů.

Abychom zjistili, jak ovlivňují anaerobní podmínky inhibici drsných forem cholátem sodným, zaočkovali jsme 1 ml sladinky s cholátem umístěný v Erlenmeyerově baňce o obsahu 250 ml suspensí 24 hod. staré drsné formy *S. fragilis* a inkubovali 24 hodin jednak za normálních podmínek, dále v atmosféře dusíku a pod parafinovým olejem. Výsledky těchto pokusů, uvedené v tabulce 4, ukazují, že inhibice nastává i za anaerobních podmínek.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Diskuse

Z uvedených výsledků je patrno, že cholát sodný úplně inhibuje rozmnožování drsných forem kvasinek na sladinkovém agaru v koncentracích, kdy u hladkých forem způsobuje jen zpomalení rozmnožování, v čemž je zřejmá obdoba s drsnými formami bakterií. Rozdíl je jen v tom, že k selektivní inhibici dochází již bez přídavku elektrolytů. Je ovšem nutno uvážit, že jsme pracovali se sladinkou, jež je vhodná pro kvasinky, zatím co Brodie a Shephard (1949) použili pro práce s bakteriemi pepticky natráveného sera. Jde tedy o úplně odlišné půdy, jež se jistě liší i obsahem elektrolytů.

Selektivní inhibice drsných forem nastává i v tekutých půdách, a to jak v nízkých, tak i ve vysokých vrstvách. Na sladinkové želatině dochází k výsledkům nepravidelným podobně jako u drsných forem bakterií. Odchylku od bakterií, jež spočívá v tom, že u kvasinek dochází k selektivní inhibici drsných forem i ve vysokých vrstvách kapaliny, lze vysvětlit tím, že drsné formy kvasinek jsou křísotvorné, takže rostou, nebo mají tendenci růst, na povrchu kapaliny, zatím co bakterie, u nichž Brodie a Shephard (1949) zjišťovali selektivní působení žlučových kyselin (*E. coli*, *Aerobacter aerogenes* a j.), se rozmnožují v kapalině. Tito autoři se domnívali, že drsné formy bakterií jsou za aerobních podmínek citlivější vůči žlučovým kyselinám. Tento zjev je však lépe vysvětlitelný tím, že soli žlučových kyselin jakožto povrchově aktivní látky se hromadí na povrchu kapaliny, takže uvnitř kapaliny je jejich faktická koncentrace mnohem nižší. Ve vysoké vrstvě kapaliny proto může růst drsných forem fakultativně anaerobních bakterií nastat. Naše pokusy za anerobních podmínek ukázaly, že k inhibici drsných forem u kvasinek dochází stejně jako za podmínek aerobních.

Působení cholátu sodného, jak bylo zjištěno v tekuté půdě, je u drsných forem rázu fungicidního. Docházelo zde po delší době k poškození buněčné blány. Normální křísotvorné kvasinky *(Hansenula, Pichia)* jsou vůči cholátu sodnému asi stejně odolné jako hladké formy ssedlinotvorných kvasinek. Některé přechodné tvary (SR) tvoří na cholátové půdě hladké, lesklé kolonie, takže by mohly být zaměněny s normálními hladkými koloniemi. Jsou však od nich dobře rozlišitelné svou průsvitností, menší velikostí a protáhlými tvary buněk. Toto silnější potlačování drsných a přechodných forem je velmi výhodné pro získávání původních hladkých forem z dissociované kultury, neboť za normálních podmínek jsou hladké formy potlačeny rozrůstajícími se formami drsnými.

Souhrn

1. Zjistili jsme, že cholát sodný inhibuje na sladince a sladinkovém agaru drsné formy kvasinek v koncentracích, kdy u hladkých forem dochází jen k snížení rychlosti rozmnožování, v čemž je obdoba s drsnými formami bakterií. Na sladinkové želatině dochází podobně jako u bakterií k výsledkům nepravidelným. Inhibice drsných forem kvasinek nastává za aerobních i anaerobních podmínek. Působení cholátu sodného na drsné formy je rázu fungicidního a projevuje se poškozením buněčné blány.

2. Přechodné formy tvoří v přítomnosti cholátu malé, lesklé, průsvitné kolonie, makroskopicky rozlišitelné od kolonií hladkých forem. Při pasážování bez cholátu poskytují opět původní suché zvrásněné kolonie.

3. Hladké formy, isolované z dissociované kultury za použití cholátu sodného, jsou stálé, takže lze této metody použít k isolaci původních hladkých forem kvasinek z kultur s pokročilou dissociací.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

4. Normální křísotvorné kvasinky jsou vůči cholátu sodnému odolné podobně jako hladké formy ssedlinotvorných kvasinek, avšak povrch jejich kolonií se v přítomnosti cholátu sodného stává vlhkým a lesklým.

Děkuji doc. Dr B. Hamplovi za zájem a připomínky při této práci.

(Obrazové přílohy VII, VIII, IX).

Literatura

Brodie, J.: *Observations on the differential inhibition of coliform bacilli and rough variants of intestinal pathogens.* J. Gen. Microbiol. 2 : 1, 1948.

Brodie, J., Shephard, W.: *Further observations on the differential inhibition of coliform bacilli and rough variants of intestinal pathogens.* J. Gen. Microbiol. 3 : 74, 1949.

Fabian, W., McCullough, N. B.: *Dissociation in yeasts.* J. Bact. 27 : 583, 1934.

Hansen, E. C.: *Experimental studies on the variation of yeast-cells.*- Ann. Botany 9 : 549, 1895.

Leopold, J., Palivec, A., Fencl, Z.: *Ke studiu myceliálních forem jedné provozní rasy Torula utilis.* Předneseno na konferenci techn. mikrobiologie v Praze 1954.

Lepeškin, W.: *Zur Kenntnis der Erblichkeit bei den einzelligen Organismen.* Cbl. Bakter. II. Abt. 10 : 145, 1903.

Mickle, W. A., Jones, C. P.: *Dissociation of Candida albicans by lithium chlorid and immune serum.* J. Bact. 39 : 633, 1940.

Redaelli, P., Ciferri, R., Cavallero, C.: *Un'ipotesi sull'eterosmosi dei lieviti in rapporto alla dissociazione.* Mycopathologia 2 : 12, 1939.

Řach, P.: *Morfologická a fysiologická degradace kvasinek při polokontinuálním provozním kvašení.* Předneseno na semináři ČSAV v Praze 1956.

Scherr, G. H., Weaver, R. H.: *The dimorfism phenomenon in yeast.* Bact. Reviews 17 : 51, 1953.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Выробочное подавление R-форм дрожжей

Л. Шилганкова

Резюме

Было установлено, что холеинокислый натрий полностью подавляет рост складчатых форм дрожжей на сусле и агаре с суслом — в тех концентрациях, при которых у гладких форм наблюдается только уменьшение скорости размножения, — в чем заключается аналогия с R-формами бактерий. На сусле с желатином, — так же, как и у бактерий, — результаты получаются неоднородные. Подавление роста складчатых форм дрожжей наблюдается как при аэробных, так при анаэробных условиях. Действие холеинокислого натрия на R-формы носит фунгицидный характер и проявляется нарушениями клеточных оболочек. Переходные формы образуют в присутствии холеинокислого натрия мелкие, блестящие, прозрачные колонии, и макроскопически отличающиеся от колоний гладких форм. При пассажах без холеинокислого натрия они вновь дают первоначальные сухие, сморщенные колонии. Изолированные с помощью холеинокислого натрия из диссоцированной культуры гладкие формы оказываются устойчивыми, так что этим методом можно пользоваться для изоляции первоначальных гладких форм дрожжей из культур со значительной диссоциацией. Нормальные дрожжи, образующие пленку, так же устойчивы по отношению к холату натрия, как и гладкие формы дрожжей, образующих осадок, однако поверхность их колоний в пристуствии холеинокислого натрия становится влажной и блестящей.

Selective Inhibition of Rough Forms of Yeasts

L. Šilhánková

Summary

It was found that sodium cholate completely inhibited rough forms of yeast on malt extract and malt extract agar in concentrations, which in smooth forms only slow down the rate of growth. This is analogous to its action on bacteria. The results in malt extract gelatin were inconsistent as in the case of bacteria. This inhibition of rough variants of yeasts takes place both under aerobic and anaerobic conditions. The action of sodium cholate on rough forms has a fungicidal character and consists in injury to the cell wall. In the presence of sodium cholate, transitional forms produce small, shining, transparent colonies, which differ macroscopically from the colonies of smooth forms. The original rough colonies are again formed on subculturing without cholate. The smooth forms isolated from a dissociated culture by means of sodium cholate are stable. This method can therefore be used for the isolation of the original smooth forms of yeasts from cultures with advanced dissociation. Normal pellicle-forming yeasts are resistant to sodium cholate in the same way as smooth forms of sediment-forming yeasts, but the surface of their colonies becomes wet and shining in the presence of sodium cholate.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 5

Rozšíření aktinomycet v rhizosféře některých obilovin

ZDENĚK ŘEHÁČEK

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 24. 4. 1956

Studium mikrobního antagonismu a antibiotik je obecně biologickým problémem těsně spjatým s úkoly praxe. Prokázaná absorpce antibiotik vyššími rostlinami a přemisťování těchto látek v rostlinách (Krasiľnikov 1951b, Zaumayer 1953, Pramer 1953, 1955, Kučajeva 1955, Crowdy a Pramer 1955) nám podává nejen důkaz o přijímání a pohybu cizích organických sloučenin rostlinou, ale potvrzuje i domněnku, že antibiotika, produkovaná do půdy, mohou ovlivnit růst rostliny, což je podnětem pro studium systematického využití antibiotik v boji proti rostlinným chorobám.

Ve spektrech antibiotických účinků antagonistů vyplňují doposud nepatrný úsek houby jako testovací organismy. Je tedy nutné hledat další mikroorganismy, produkující látky s protihoubovým účinkem. Houby jsou četnými původci nemocí kořenů rostlin a podle Stessela, Lebena a Keitta (1953) tvoří nejpočetnější skupinu, proti níž se bojuje chemickými prostředky, které však mají své nevýhody (otázka délky působení). Velmi vhodnými pro boj proti fytopatogenním houbám se zdají být svými vlastnostmi aktinomycety. Jsou mezi půdními saprofytickými mikroorganismy bohatě zastoupeny a množstvím i rozmanitostí antagonistů zaujímají čelné místo mezi půdními mikroby. Podle Sorauera (Rehm a Rehmová 1953) a také podle prací Rehma a Rehmové (1953) je převážná část aktinomycet nepatogenní pro trávy, což by při jejich použití, na příklad pro aktinomycetisaci semen, splňovalo jeden z důležitých předpokladů od antagonisty požadovaných. Aktinomycety jsou převážně organismy mesofilní až psychrofilní; v počtu svých zárodků jsou stálejší než houby a bakterie. Enzymatický aparát aktinomycet je bohatší než enzymatický aparát sporulujících mikroorganismů (Mišustin 1954).

Domníváme se, že základním předpokladem pro možnost využití antibiotických vlastností aktinomycet ve fytopatologické praxi je poznání dynamiky počtu aktinomycet v půdě, a to zejména v těch oblastech, kde je mikrobní aktivita vysoká a nebezpečí napadení rostliny patogenem nejčastější, t. j. v půdě přilehlé ke kořenům rostlin. V této práci jsme sledovali zastoupení zárodků aktinomycet v přikořenové zoně pšenice, ječmene a ovsa, a to v různých růstových fázích obilovin.

Materiál a metody

Příprava a zpracování půdních vzorků. Sledovali jsme zastoupení zárodků aktinomycet v přikořenové zoně (Berezova 1953) jarní pšenice „Vega", ječmene „Stupický Hanák" a ovsa „Rychlík". Použili jsme materiálu z pokusů Vágnerové (1956), která studovala rhizosferní mikrofloru těchto obilovin. Vzorky jsme odebírali současně z kontrolní neoseté parcelky a z parcel s příslušnými rostlinami v různých fázích jejich vývoje: před zasetím, při vzcházení rostlinek, ve fázi třetího listu, při odnožování, sloupkování, metání, v květu, v době zralosti a 14 dní po sklizni. Vzorky jsme zpracovávali do 24 hod. po odběru. Kořenový systém jsme odstraněním přilehlé půdy uvolnili, zbylou půdu s kořenů setřásli a smyli, důkladně promíchali a upravili sterilní vodou na konečné ředění 1 : 10 000. Počet zárodků aktinomycet jsme stanovovali centrifugační metodou (Řeháček 1956). Průměr počtů kolonií z pěti výsevů každého analysovaného vzorku jsme přepočítávali na množství zárodků v 1 g sušiny půdy.

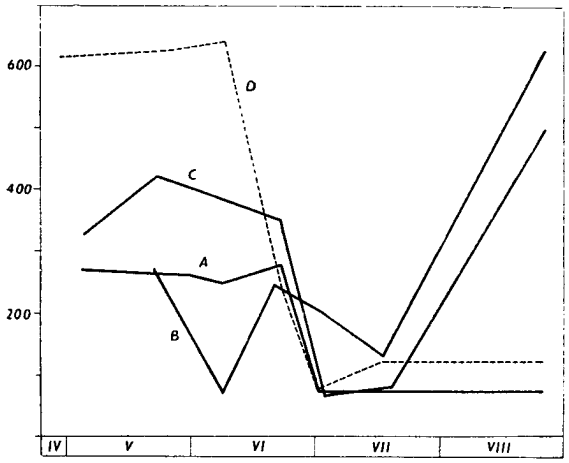
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Sledování antifungálních vlastností aktinomycet. Pro zjištění protihoubového účinku isolovaných aktinomycet jsme si upravili metodu standardních kolonií (Skinner 1950). Z 12denní kultury aktinomycety jsme připravili vodnou suspensi spór, z které jsme pak Pasteurovou pipetou přenesli vždy jednu kapku do každého sterilního skleněného komínku o vnitřním průměru 7 mm a o výšce 12 mm, ponořeného do syntetické půdy SRI (Krasiľnikov 1950) nebo do půdy C s kukuřičným extraktem (Ševčík 1952). Na Petriho misku o průměru 12 cm jsme naočkovali celkem 6 kmenů, každý kmen do tří komínků. Po pětidenní inkubaci misek při teplotě 27 °C jsme skleněné komínky odstranili a agarové válečky porostlé koloniemi aktinomycet jsme přenesli na zaočkovanou titrační půdu tohoto složení: glukosa 25,0 g; NH_4NO_3 2,5 g; KNO_3 1,4 g; K_2HPO_4 1,4 g; $MgSO_4 . 7H_2O$ 5,0 g; agar 20,0 g; dest. H_2O 1000,0 ml; pH 6,0. Pro zaočkování titrační půdy jsme používali zástupců deuteromycet, proti nimž jsme hledali mezi půdními aktinomycetami vhodné antagonisty; byly to *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum* a *Alternaria solani*. Titrační půdu jsme připravovali z 50 ml rozehřáté popsané půdy, kterou jsme po ochlazení na 45 °C zaočkovali dvěma ml vodní suspense spór testovacího mikroba. Toto inokulum jsme získali suspendováním obsahu jedné očkovací kličky, odebraného se 7denní šikmé agarové konservy testovací houby v 5 ml sterilní destilované vody. Zaočkovanou půdu s přiloženými agarovými válečky jsme uchovávali 16 hodin v lednici a pak 40 hod. při teplotě 27 °C.

Výsledky

Aktinomycety byly přítomny v přikořenových zonách studovaných obilovin během všech pozorovaných fází růstu rostlin (tab. 1, obr. 1). Reakce půdních vzorků (pH) a zjištěný obsah vlhkosti se zdály být podle dosavadních zkušeností pro aktinomycety příznivé.



Obr. 1 — Dynamika počtu zárodků aktinomycet v přikořenových zonách obilovin pšenice, ječmene, ovsa a v kontrolní neoseté půdě. Osa x: vegetační doba (měsíce); osa y: počet zárodků aktinomycet v tisících, Křivky: Počet zárodků aktinomycet v přikořenové zoně pšenice (A), ječmene (B), ovsa (C) a v kontrolní neoseté půdě (D).

V přikořenové zoně ječmene množství zárodků aktinomycet po zasetí obilek klesalo. Teprve když rostlina dospěla do fáze odnožování, počet aktinomycet se prudce zvýšil. Když ječmen sloupkoval, dosáhl počet aktinomycet prvého maxima, pak opět klesal a po květu počal stoupat k druhému maximu, k němuž dospěl v době zralosti rostliny. Po sklizni ječmene zárodků aktinomycet ubývalo.

Křivka, znázorňující počet aktinomycet v přikořenové zoně ovsa, měla z počátku stoupající tendenci, v době třetího listu rostliny prošla prvním maximem, pak klesala. Metání a květ ji zastihly v minimu. Zastoupení aktinomycet v srpnu a v září bylo velmi podobné zastoupení těchto mikroorganismů v přikořenové zoně ječmene, t. j. směrem ke zralosti vzrůstalo, dosáhlo nejvyšších hodnot a pak klesalo.

Aktinomycety v přikořenových zonách pšenice zaznamenaly své maximum v době sloupkování rostliny. Po prudkém poklesu se pak během metání, květu a zralosti pšenice jejich počet téměř neměnil.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

V kontrolní neoseté půdě jsme zjistili nejvíce zárodků aktinomycet v jarních měsících. Minimum bylo časově shodné s minimy aktinomycet pod pšenicí a ovsem. V červenci a v srpnu se počet aktinomycet zvýšil poměrně slabě.

Ze 127 isolovaných kmenů aktinomycet potlačovalo růst zástupců deuteromycet 28 kmenů, t. j. 22 %. Aktinomycety s protihoubovým účinkem, isolované z půdy přilehlé ke kořenům obilovin nebo isolované z kontrolní neoseté půdy, se mezi sebou znatelněji nelišily ani počtem antagonistů ani stupněm antibiotické aktivity.

Tab. 1. Dynamika počtu zárodků aktinomycet v přikořenových zonách ovsa, pšenice a ječmene a v kontrolní neoseté půdě

Vývoj rostliny	Datum odběru	Půda		Počet aktinomycet v 1 g sušiny	Datum odběru	Půda		Počet aktinomycet v 1 g sušiny
		pH	sušina %			pH	sušina %	
Oves					Pšenice			
Před zasetím	29. 4.	6,3	82	341	29. 4.	6,2	83	241
Vzcházení	4. 5.	6,3	80	325	4. 5.	6,3	81	271,6
3. list	22. 5.	6,4	80	425	22. 5.	6,4	80	262,5
Odnožování	8. 6.	6,2	78	384,6	8. 6.	6,4	79	253,2
Sloupkování	22. 6.	6,9	85	350	22. 6.	6,8	85	282,3
Metání	2. 7.	6,7	86	70	1. 7.	6,5	86	69,7
Květ	19. 7.	6,4	82	73,1	19. 7.	6,5	84	71,4
Sklizeň	26. 8.	6,6	80	500	26. 8.	6,4	83	72,2
Po sklizni	19. 9.	6,6	84	119	19. 9.	6,6	80	75
Ječmen					Neosetá půda (kontrola)			
Před zasetím	29. 4.	6,3	82	609,8	29. 4.	6,1	81	617
3. list	22. 5.	6,4	80	262,2	22. 5.	6,4	80	625
Odnožování	8. 6.	6,6	79	75,9	8. 6.	6,6	81	640,7
Sloupkování	21. 6.	6,9	87	253,2	22. 6.	6,7	82	243,9
Metání	1. 7.	6,6	83	204,8	1. 7.	6,7	84	71,3
Květ	16. 7.	6,8	79	126,6	16. 7.	6,6	82	121,9
Sklizeň	26. 8.	6,6	80	625	26. 8.	6,7	81	121,8
Po sklizni	19. 9.	6,6	80	150	19. 9.	6,0	81	49,3

Poznámka: Počty zárodků aktinomycet jsou uvedeny v tisících.

U kmenů z kontrolní půdy jsme zjistili protihoubový účinek u 28 %. Kmeny, isolované z přikořenové zony ječmene, obsahovaly 20 % antagonistů hub. Stejné zastoupení aktinomycet s protihoubovým účinkem jsme shledali u kmenů z přikořenové zony pšenice a ovsa.

Z testovacích organismů bylo nejcitlivější *Fusarium nivale*, jehož růst inhibovalo ze 127 kmenů 18,8 %. Proti houbě *Fusarium oxyporum* bylo účinných 14,1 % testovaných aktinomycet. *Alternaria solani* byla nejméně citlivá, její růst potlačovalo pouze 5,5 % antagonistů.

Diskuse

Hojnější zastoupení aktinomycet v přikořenových zonách mladých rostlinek, u nichž bývá nebezpečí napadení parasitickou houbou největší, pokládáme s hlediska možnosti využití antagonistických vlastností aktinomycet ve fytopatologii za velmi

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

slibné. Avšak ani z nižšího počtu aktinomycet v době metání rostlin neusuzujeme, že by potenciální aktivita těchto mikroorganismů byla nízká. Nasvědčují tomu také závěry Waksmana a Starkeye (1947), kteří pozorovali po přidání vhodných živin rychlejší růst počtu mikrobů a rychlejší zužitkování živin v pískové půdě než v půdě těžké.

Vágnerová (1956) zjistila mezi mikroflorou kontrolní neoseté půdy a mikroflorou přikořenových zon studovaných obilovin pouze kvantitativní rozdíl, v kontrolní neoseté půdě byla mikroflora chudší. Těmto výsledkům odpovídají i některá naše zjištění, získaná při sledování zastoupení aktinomycet. V přikořenových zonách ječmene a ovsa se patrně značně uplatnil vliv organického materiálu, provázejícího zralé rostliny — kontrolní neosetá půda byla ve stejné době aktinomycetami chudší. V přikořenové zoně pšenice působily ještě další faktory. Je zajímavé, že podobné výsledky získal také Vágner (1955) při sledování užší rhizosféry jarní pšenice. Domníváme se, že je zde nutno vzít v úvahu vliv rostlin v daných fázích jejich vývoje. Předpokládáme však, že také rhizosféra působila na aktinomycety mocnou stimulací, která se měnila na příklad podle druhu a stáří rostliny, podle obsahu vlhkosti atd. Neméně důležitým činitelem pro rozvoj aktinomycet v půdě byla teplota půdy, kolísající v závislosti na střídání dne a noci. Okolní faktory mohly působit přímo na mikroorganismy přikořenových zon, nebo nepřímo stimulací či inhibicí vývoje rostlin.

Dynamika počtu zárodků aktinomycet byla obdobou pohybu plísní, který v uvedených půdách zaznamenala Vágnerová (1956). Rozmístění antagonistických aktinomycet velmi připomínalo rozmístění půdních hub popsané Timoninem (1940), který ve svých pokusech neshledal výraznějšího rozdílu mezi zástupci hub rhizosféry ječmene, ovsa a vojtěšky a mezi zástupci hub půdy, vzdálené od kořenů. Domníváme se, že uvedené výsledky podporují domněnku (Krasiľnikov 1951a), že jednou z příčin vzniku antibiotické látky mohou být takové biochemické pochody, které probíhají v buňce antagonisty pod vlivem delšího jeho styku s těmi mikroorganismy, jejichž zástupci se později stávají ukazateli spektra jeho antibiotického účinku.

Souhrn

Sledovali jsme dynamiku počtu zárodků aktinomycet v přikořenových zonách pšenice, ječmene a ovsa během vegetačního období rostlin. U isolovaných aktinomycet jsme zjišťovali jejich antifungální vlastnosti.

Aktinomycety byly přítomny v přikořenových zonách obilovin ve všech studovaných fázích růstu rostlin. S hlediska možnosti využití antagonistických vlastností aktinomycet ve fytopatologické praxi pokládáme za velmi slibné hojnější zastoupení aktinomycet v přikořenových zonách mladých rostlinek, u nichž bývá nebezpečí napadení parasitickou houbou největší.

Rozmístění aktinomycet s antifungálními vlastnostmi bylo velmi podobné rozmístění půdních hub — nebylo výraznějšího rozdílu mezi antagonisty z přikořenových zon obilovin a antagonisty z kontrolní neoseté půdy. Ze 127 isolovaných kmenů inhibovalo 22 % růst testovacích mikroorganismů *Fusarium nivale, Fusarium oxysporum* a *Alternaria solani*.

Autor děkuje za technickou spolupráci L. Kubálové.

Literatura

Berezova, E. E.: *O roli mikroorganizmov v pitaniji rastenij*. Sbornik trudov rasširennovo plenuma sekciji udobrenij. Moskva 1953.

Crowdy, S. H., Pramer, D.: *Movement of antibiotics in higher plants*. Chem. Ind. 7 : 160, 1955.

Krasiľnikov, N. A.: *Aktinomicety — antagonisty i antibiotičeskije veščestva*. Moskva 1950.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Krasiľnikov, N. A.: *Biologičeskoje značenije antibakteriaľnych veščestv.* Trudy inst. mikrobiol. 1 : 142, 1951a.
Krasiľnikov, N. A.: *Usvojenije kornjami rastenij produktov žiznedejateľnosti mikrobov.* DAN 79 : 879, 1951b.
Kučajeva, A. G.: *O proniknoveniji antibiotikov v mnogoletnyje rastenija.* Mikrobiologija 24 : 316, 1955.
Mišustin, J. N.: *Zakon zonaľnosti i učenije o mikrobnych associjacijach počvy.* Usp. sovr. biol. 37 : 1, 1954.
Pramer, D.: *Observations on the uptake and translocation of five actinomycete antibiotics by cucumber seedlings.* Ann. Appl. Biol. 40 : 617, 1953.
Pramer, D.: *Absorption of antibiotics by plant cells.* Science 121 : 507, 1955.
Rehm, H. J., Rehm, U.: *Untersuchungen über die Bodenmikroflora von Gatersleben und Umgebung.* Kulturpflanze 1, 1953.
Řeháček, Z.: *Stanovení počtu zárodků sporulujících aktinomycet v půdě a jejich isolace.* Čs. mikrobiol. 1 : 129, 1956.
Skinner, F. A.: *Preparation of standardised actinomycete colonies.* Nature 166 : 314, 1950.
Stessel, G. J., Leben, C., Keitt, G. W.: *Screening tests disigned discover antibiotics suitable for plant disease control.* Mycologia 45 : 355, 1953.
Ševčík, V.: *Růst a produkce antibiotik u Streptomyces griseus na pevných půdách.* Čs. biologie 1 : 32, 1952.
Timonin, M. J.: *The interaction of higher plants and soil microorganisms.* Can. J. Res. C. 18 : 307, 1940.
Vágner, M.: *Zastoupení hlavních fysiologických skupin bakterií v rhizosféře během vývoje rostlin.* Sborník ČSAZV - Rostl. výroba 28 : 198, 1955.
Vágnerová, K.: *Rhizosférní mikroflora pšenice, ječmene a ovsa a různých odrůd ovsa.* Referát na konferenci půdních mikrobiologů v Liblicích 1956.
Waksman, S. A., Starkey, R. L.: *The soil and microbe.* New York 1947.
Zaumayer, W. J.: *Streptomycin spray.* Chem. Eng. News 31 : 3960, 1953.

Распространение актиномицетов в зоне корней некоторых злаков в течение вегетации

З. Ржегачек

Резюме

Мы исследовали динамику количества клеток актиномицетов в прикорневых зонах пшеницы, ячменя и овса в течение периода их вегетации. У изолированных актиномицетов мы определяли их противогрибковые свойства. Актиномицеты находились во внешней ризосфере ячменя, пшеницы и овса в течение всех исследовавшихся фаз роста растений. Их количество сильно колебалось. Мы считаем весьма многообещающим, — с точки зрения использования в фитопатологии антагонистических свойств актиномицетов, — присутствие большого количества актиномицетов в зоне корней молодых растений, у которых опасность поражения паразитическими грибками особенно велика. Размещение актиномицетов с противогрибковыми свойствами весьма напоминало размещение почвенных грибков. Не наблюдалось сколько-нибудь выразительной разницы между антагонистами из почвы, прилегающей к корням злаков, и антагонистами в контрольной незасеянной почве. 22% из 127 изолированных нами штаммов подавляло при испытаниях рост микроорганизмов Fusarium nivale, Fusarium oxysporum и Alternaria solani.

Spreading of Actinomyces in the Rhizosphere of Some Grains

Z. Řeháček

Summary

A study was made of the dynamics of the number of actinomyces in the zones immediately adjacent to the roots of wheat, barley and oats, during the vegetative period of the plants. In isolated actinomyces a determination was made of their anti-fungal properties. Actinomyces was found in the external rhizosphere of barley, wheat and oats during all phases of growth of the plants. Their number showed considerable variations. From the aspect of the possibility of using the antagonistic properties of Actinomyces in phytopathology we regard the large quantities of Actinomyces found in the root zones of young plants, in which the danger of attack by a parasitic fungus is greatest, as very promising. The distribution of Actinomyces with anti-fungal properties was very similar to that of soil fungi and there was no marked difference between the antagonists from the soil adjacent to the roots of the grain and antagonists in control soil that had not been sown. Of 127 strains isolated, 22% inhibited the growth of the test microorganisms Fusarium nivale, Fusarium oxysporum and Alternaria solani.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 1. (1956) — č. 5

Septikemie bource morušového

JAROSLAV WEISER a OLEG LYSENKO
Československá akademie věd, Biologický ústav, oddělení patologie hmyzu, Praha
Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 6. 2. 1956

Přes to, že u nás je bourec morušový pěstován již drahnou dobu, nemáme dosud žádných zpráv o jeho nemocích, které by se opíraly o domácí údaje. Z dosud podchyceného materiálu z posledních čtyř let jsme mohli zjistit, že se u nás vyskytují mykosy, působené *Beauveria bassiana*, polyedrie a bakterijní onemocnění. Naproti tomu mikrosporidii *Nosema bombycis* jsme v dodaném materiálu nezjistili a pokud nám byly dodány housenky s anamnesou pébrina, nešlo nikdy o nákazu mikrosporidií. Kdežto onemocnění, působená plísní i virusem, jsou omezena jen na některé, obyčejně zanedbanější chovy, náleží bakterijní onemocnění mezi nemoci velmi časté, postihující téměř všechny chovy možno říci standardními úbytky housenek, které někde přecházejí až v masová hynutí.

V literatuře nalézáme řadu prací o mikrobech, patogenních pro bource morušového; ovšem většina, zvláště starších prací, trpí nedostatečností popisů isolovaných mikrobů. Sawamura (1906) uvádí jako patogenní pro hedvábníka: *Bacillus ellenbachi (= cereus)*, *B. fuchsinus (= Sarcina fuchsina)*, *B. megatherium*, *B. mycoides (cereus-mycoides)*, *B. rubefaciens (= Bacterium r.)*, *B. viridans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Z ostatních nálezů dalších autorů můžeme ještě uvést: *Bacillus orpheus* (White 1912), *B. sotto (= cereus)* (Aoki a Chigasaki 1915), *Diplococcus bombycis* (Paillot 1922), *Proteus bombycis* (Glaser 1924), *B. bombysepticus* (Hartmann 1931), *B. bombycis non liquefaciens* (Paillot 1933), *Serratia marcescens* (Masera 1936), *B. bombycoides (= soto?)* (Paillot 1942), *Bacillus bombycis* a *Streptococcus bombycis* (Masera 1954). Byla zaznamenána i značná citlivost hedvábníka pro *Bacillus thuringiensis*, jakož i jemu blízký *Bac. cereus* var. *alesti* (Toumanoff a sp. 1954, 1955).

Michajlov (1950) rozlišuje u bakterijních nákaz tři hlavní typy: septikemii, chřadnutí (čachlost) a mrtvičnost. Septikemie a chřadnutí odpovídá francouzskému pojmu „flacherie" a projevuje se jako onemocnění, při němž se bakterie dostávají do tělní dutiny a rozmnožují se v haemolymfě housenky ještě živé, takže příčinou uhynutí je rozklad tkání a množství metabolitů a toxinů přímo v haemolymfě. Při mrtvičnosti naopak dochází k uhynutí housenek, zatím co bakterie jsou ještě ve střevě; jde tu především o toxikosu, jaká je známa při působení spor *Bacillus thuringiensis*. Kdežto mezi původce mrtvičnosti musíme počítat především *Bacillus thuringiensis*, *B. bombycoides*, *B. sotto* a *B. cereus* var. *alesti*, nacházíme mezi původci septikemie u bource podle Michajlova *Proteus vulgaris*, *P. bombycis*, *Bacterium turcestanicum* (jehož popis je nápadně podobný *Pseudomonas hydrophilla*) a *Bacillus apisepticus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens liquefaciens*, *Ps. pyocyanea* a blíže neurčená flavobakteria. Střevní mikroflora zdravých housenek bource se od horního výčtu dosti značně liší. Masera (1936, 1954) tu zastihl *Bacterium fermentum* (snad se jedná o *Lactobacterium f.*), *B. turcosum*, *Bacillus simplex*, *B. mesentericus ruber*, *B. novus*, *B. subtilis*, *Micrococcus candidus*, *M. cinabarus*, *M. caseolyticus*, *M. varians* a *M. pyogenes* var. *albus*.

Materiál a metody

Příznaky onemocnění. Housenky bource morušového rasy „Maďarská žlutá", která je u nás nejčastěji pěstována, postižené septikemií, šednou zprvu do barvy olova, vrhnou vodnatou potravu a brzo po té se dostavuje smrt. Tělo mrtvé housenky hadrovitě změkne, je šedočerné, nabíhá do hnědých tónů. Když

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

je mechanicky nepoškodíme, zasychá pozvolna, aniž by se mezičlánkové záhyby pokožky macerovaly a praskaly. V okamžiku hynutí je celá tělní dutina vyplněna čistou kulturou mikroba, který vyvolal onemocnění. Teprve po uhynutí housenky počne do těla pronikat ještě další mikroflora ze střeva a jednotný původní obraz se mění. Housenky se stejnými příznaky, zaslané z různých míst, ukázaly při vyšetření nákazu stejným mikrobem.

Původce onemocnění. Jako původce onemocnění byl isolován a identifikován *Pseudomonas noctuarum* White 1923. Epizootie způsobená tímto mikrobem nebyla z bource dosud popsána. Zato je mikrob dobře znám jako patogenní mikrob pro jiné motýly. Tak White (1923a) jej isoloval z uhynulých housenek můry osenní a nazval jej *Bacillus noctuarum*. Postupně se ukázalo, že je identický s *Bacillus leptinotarsae* (White 1928) a *Bacillus sphingidis* (White 1935). Steinhaus (1947) uvádí, že je možno *B. sphingidis* od *B. noctuarum* odlišit serologicky. Od *Coccobacillus elingeri* se liší svojí pohyblivostí. V moderních kompendiích mikrobiologie není v zařazení *Ps. noctuarum* jednotnosti. Bergey's Manual (1948) jej řadí jednak k escherichiím jako *E. noctuarii* (1930), jednak jako *Proteus noctuarum* (1934). Krasiľnikov (1949) jej uvádí jako *Pseudomonas noctuarum* (kteréžto označení dále užíváme) a vedle toho ještě *Bacillus sphingidis* jako *Pseudomonas sphingidis*, bez ohledu na práci Whiteovu (1935), která dokazuje synonymitu obou. Za zmínku ještě stojí, že *Ps. noctuarum* je svými vlastnostmi velmi podobný *Achromobacter liquefaciens*.

Patogenitu pro hmyz zjistil již White při původním popise, kdy mikroba isoloval z můry osenní, *Euxoa segetum*, později byl tento mikrob znovu prokázán v mandelince bramborové v synonymu *B. leptinotarsae* a u lyšajů jako *B. sphingidis*. Všichni autoři zaznamenávají zkušenost, že přímá infekce potravou v pokusech byla velmi obtížná, takže si bylo možno jen obtížně vysvětlit vznik epizootií u hmyzu. Při tom ovšem nákazy injekcí do haemolymfy tělní dutiny byly vždy na 100% smrtelné. Tomuto stavu odpovídá i způsob výskytu v našem případě.

Pseudomonas noctuarum White (popis kmene Bm h 1)

V dnešním stavu vědomostí o *Ps. noctuarum* chybí především přesné systematické zařazení a proto zde uvádíme důkladnější popis našeho kmene. Z popisu rovněž vyplývá opodstatněnost zařazení tohoto mikroba do rodu *Pseudomonas*.

Buňky na masopeptonovém agaru po 24 hod. při 25 °C jsou krátké, rovné tyčinky, oblých konců, rovných stran, stejnoměrně se barvící, samostatné, po dvou nebo v hloučcích; tvoří velmi malá pouzdra; jsou aktivně pohyblivé pomocí 1 až 2 polárních bičíků. Rozměry $0{,}8 \times 0{,}8$ až 2 μ. Gramnegativní (obr. 1).

Kolonie na masopeptonovém agaru po 24 hod. při 25 °C jsou kulaté, 1,5 až 2 mm v průměru, vypouklé, mají povrch hladký, lesklý, porcelánově bílý; průsvitné okraje iridují v procházejícím světle. Okraj kolonie je rovný, hladký. Nepigmentuje. Konsistence máslovité, lehce emulsivní ve vodě (obr. 2 a 3).

Kolonie na krevním agaru 24 hod. při 25 °C jsou modravě bílé, ostatní vlastnosti jsou shodné jako na MPA. Nehemolysuje.

Na bramboru roste slabě nažloutlým náletem. Vpich v MPA je hřebíkovitý s perličkovitým růstem do hloubky. Na šikmém agaru (MPA) tvoří nitkovitý růst s rovnými okraji, vypouklý, okraje iridují. V bujonu tvoří při povrchu slabou blanku a prstenec, hustý homogenní zákal a nepatrný bílý sediment.

Růstové požadavky a vlastnosti. Je to heterotrof, aerobní až fakultativně anaerobní, katalasa positivní. Teplotní rozmezí růstu mezi 10 až 37 °C s optimem mezi 20 až 25 °C. Na Czapek-Doxově mediu roste dobře. Želatinu zkapalňuje celkově, má bílý perličkovitý růst v hloubce vpichu za tvorby bublinek plynu a slabé blanky na povrchu. Lakmusové mléko sráží během 24 hod., slabě alkalisuje, nepeptonisuje. Citrátů využívá jako zdroje uhlíku (Simonsovo medium). Nitráty velmi slabě redukuje na nitrity; sirovodík neprodukuje; amoniak z peptonové vody tvoří jen velmi slabě; MRT a VPR negativní; indol netvoří (z tryptického bujonu Ehrlichovým reag.); ureasu netvoří (Christensenovo med.); za tvorby plynu a kyseliny zkvašuje glukosu, laktosu, maltosu, sacharosu, manitol, arabinosu, fruktosu, glycerol (indikátor methylčerveň).

Normální mikroflora střeva housenek bource morušového. V daném chovu bource morušového rasy „Maďarská žlutá" se běžně vyskytovaly ve střevě tyto mikroby: *Micrococcus varians* (ve dvou různých kmenech L_1 a $Ž_2$), *Sarcina flava a Pseudomonas hydrophilla* jakož i *Pseudomonas noctuarum*. Přesný popis vlastností těchto mikrobů je uveden v Bergeyovi (1948), zde uvádíme jen odchylky našich kmenů proti základnímu popisu.

Pseudomonas hydrophilla je pohyblivý podle způsobu pohybu polárními bičíky, ale ty nebyly barvením prokázány. Všechny ostatní vlastnosti se shodují se základním popisem, rozdíly jsou jen v intensitě jeho kvasných vlastností.

Micrococcus varians. Kmeny L_1 a $Ž_2$ se liší od základního popisu barvou kolonie, která je zde oranžová (proti žluté v Bergeyovi), při další kultivaci však kolonie na masopeptonovém agaru ztrácejí pigment a zůstávají nadále jen bílé (zvláště kmen L_1). Oba kmeny se liší od sebe tím, že L_1 zkapalňuje želatinu a nezkvašuje laktosu, kdežto kmen $Ž_2$ nezkapalňuje želatinu a kvasí laktosu za produkce kyseliny.

Sarcina flava zcela odpovídá popisu v Bergeyovi.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Vedle těchto mikrobů jsme nalezli jako sekundární infekci housenek ještě *Bacillus sphaericus*. Byl isolován z mrtvých housenek bource. Není patogenní ani při perorálním podání, ani při injekci. Vlastnostmi odpovídá popisu v Bergeyovi.

Pseudomonas noctuarum, nalézaný normálně v mikroflóře housenčího střeva, neměl odchylných vlastností od shora uvedeného popisu.

Pseudomonas noctuarum náleží tedy k běžným střevním mikrobům rasy „Maďarská žlutá", aniž by jeho přítomnost sama o sobě byla doprovázena septikemií. Potvrzuje se tedy znovu již Whitem u *B. leptinotarsae* pozorovaný jev a nepatrná patogenita pro hostitelský hmyz za normálních podmínek. Rovněž chybí vysvětlení mechanismu přenosu a působení mikroba. Jak shrnuje Steinhaus (1949), dochází k nákaze pravděpodobně po požití dostatečné dávky mikroba, ačkoliv v podmínkách našeho pokusu ani tato cesta nebyla dosti úspěšná, ve srovnání se 100% nákazou dosaženou injekcí. Malou vnímavostí k perorální infekci pro mikroba se snad dá vysvětlit i poměrně řídký výskyt nákazy v přírodě. Též u *B. leptinotarsae* uvádí White, že se mikrob normálně vyskytuje ve střevě zdravých larev. Injekcí mikroba do tělní dutiny možno dosáhnout septikemie u dalších druhů hmyzu. Sem náleží i bourec morušový.

Pokusili jsme se touto prací odpovědět na některé z nevyjasněných okolností přenosu a nákazy hmyzu mikroorganismem *Pseudomonas noctuarum*.

Výsledky

Patogenita Ps. noctuarum pro bource při injekci. K pokusům jsme použili 3. až 5. stadia housenek bource morušového rasy „Maďarská žlutá". Před pokusy jsme housenky chovali v karanténě a krmili čistě omytým listím.

K infikování jsme použili sbírkového kmene *Ps. noctuarum*, který byl nejprve injekčně pasážován zdravou housenkou; z ní isolovaná primokultura *Ps. noctuarum* byla suspendována do sterilního 0,6% fysiologického roztoku (klička bakterijní masy do 3 ml a odtud 1 klička suspense opět do 3 ml). Housenkám jsme asepticky injikovali asi 0,1 ml suspense mikroba do tělní dutiny na hřbetní straně mezi 6. a 7. zadečkový článek; „krvácení" bylo zabráněno kápnutím colodia na ranku.

Po injekci 24 hod. kultury *Ps. noctuarum* skleněnou kapilárou do tělní dutiny housenek jsme dosáhli uhynutí 100 % housenek během 3 dnů od infekce (obr. 4 A), zatím co v kontrole, kde byl vstřikován sterilní fysiologický roztok, došlo k uhynutí 60 % housenek sekundární infekcí (obr. 4 B). Podílela se tu i nákaza *Ps. noctuarum*, která se rozmohla po poškození a zeslabení hostitele.

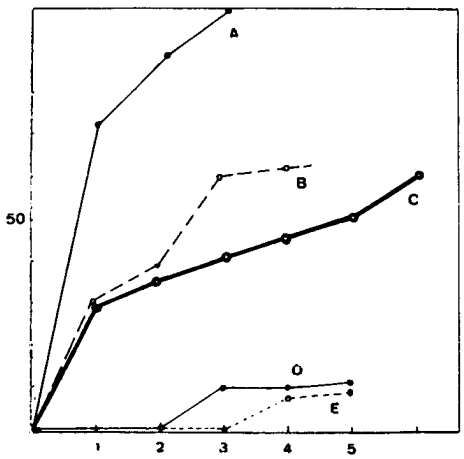
Patogenita Ps. noctuarum pro bource při perorálním podávání. Při podání listí, silně natřeného kulturou *Ps. noctuarum*, objevila se až třetího dne mortalita dosahující jen 14 %, takže o infekci zvýšenou dávkou mikrobů nemůže být řeči (obr. 4 D). Z těchto porovnání vyplývá, že *Ps. noctuarum* je pro housenky bource morušového patogenní, jakmile se dostane do jejich tělní dutiny. Když však se dostane do nepoškozeného střeva, nepůsobí smrt ani při mnohokrát zvýšené dávce a zůstává běžným střevním mikrobem housenky. Zmnožení mikroba v potravě není tedy samo o sobě podmínkou nákazy housenky.

Když sledujeme zařízení hmyzu, která jej chrání před zásahy z vnějšího prostředí a srovnáme je s obdobou u obratlovců, vidíme, že tu jsou podstatné rozdíly. Tělo obratlovce je vystaveno stálému pronikání mikroorganismů zvenčí kůží a jejími oděrkami, sliznicemi na povrchu i uvnitř těla. Má proto vytvořen účinný všestranný obranný aparát korpuskulární i humorální. Naproti tomu hmyz má na povrchu těla silný chitinosní pancíř, který nelze běžně protrhnout, takže jím mikroby nepronikají. Uvnitř trávicí trubice má pak přední i zadní část chitinosní intimu, odpovídající stavbou pokožce. V entodermálním mesenteronu sice chitinosní pokryv vyvinut není, ale jeho ochrannou funkci nahrazuje souvislá trubice, peritrofická membrána, stále nově vznikající na rozhraní předního a středního střeva a procházející celým zažívacím traktem nebo oddělovaná sekrecí s povrchu celého mesenteronu. Prochází tedy ochranný, potravu vedoucí rukávec, celým zažívacím traktem až do řitní části traktu, u některých druhů dokonce vyčnívá ještě z těla ven. Je tedy celé tělo chrá-

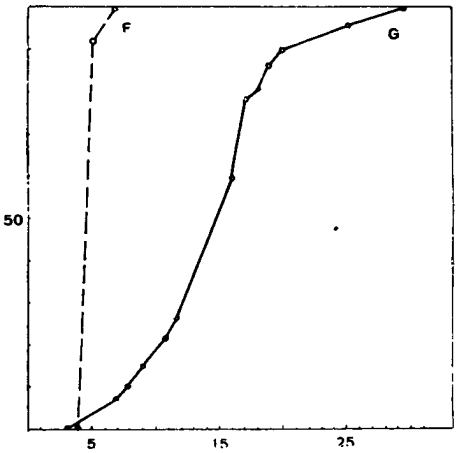
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

něno u hmyzu interním pokryvem, znemožňujícím proniknutí bakterií. Tento rozdíl proti obratlovcům projevuje se u hmyzu i rozdílem obranného systému, charakterisovaného minimální fagocytosou normálních patogenů a nedostatkem protilátek.



Obr. 4. Průběh hynutí housenek bource morušového při infekci mikrobem *Pseudomonas noctuarum*. A — injekce mikrobů; B — injekce fysiologickým roztokem; C — směs skleněného prášku a kultury bakterií; D — nákaza bakteriemi na listu; E — kontrola, normálně krmené housenky. Osa x: čas ve dnech, osa y: % mrtvých.



Obr. 5. Septikemie I. stadia housenek *Hyphantria cunea* při nákaze mikrosporidií *Thelohania hyphantriae* — F. G — průběh septikemie v zapařeném chovu *Hyphantria cunea*.

Nejzranitelnějším místem hmyzího těla zůstává peritrofická membrána. Je to jednak blanka velice jemná, jednak po poškození neregeneruje a náprava se děje jen postupnou její výměnou dorůstáním od cardie. Jakmile mikrobi proniknou mezi peritrofickou membránu a stěnu střevního epithelu, mají možnost projevit se jako patogenní, podle své schopnosti pronikat do hmyzí tkáně a podle své schopnosti vytvářet toxické látky. Podle těchto vlastností se dělí mikrobi ve střevě hmyzu na dvě kategorie: na normální nepatogenní střevní pasanty a na „oportunisty" ve smyslu Steinhausově (1949). První nejsou patogenní ani při injekci do tělní dutiny housenky. Druzí jsou patogenní, jakmile se dostanou do tělní dutiny nebo tkání hmyzu. Podle dosavadních našich znalostí není jiné kategorie mikrobů u hmyzu, neboť t. zv. přímí patogeni, jako je *Bac. thuringiensis*, jsou oportunisty, dokud nedojde k sporulaci nebo k vniknutí jejich spor do zažívacího traktu hmyzu. Teprve jejich spory a zplodiny při sporulaci poškozují střevo toxiny a do takto poškozeného střeva pronikají oportunisté, vegetativní formy mikroba.

Patogenita Ps. noctuarum pro bource při poškození peritrofické membrány. U našeho *Ps. noctuarum* však s poškozením střeva toxiny spor nemůžeme počítat. Musíme proto hledat jiný výklad jeho náhlé účinnosti. Předpokladem našeho uvažování bylo poškození peritrofické membrány, dovolující proniknutí mikrobů do nekontaminované prostory těsně na střevní výstelce. Jako prostředku pro pokus poškození peritrofické membrány jsme použili skleněného prachu, připraveného z rozmělněných skleněných kapilár (třeny až do ztráty lesku). Když housenkám bource morušového (III. a IV. stadium), majícím normálně *Ps. noctuarum* jako střevního pasanta, bylo

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

podáno listí moruše, postříkané suspensí skelného prachu a bakterijní kultury, bylo možno zaznamenat náhlé stoupnutí mortality: první den 30% a stálý vzestup až k úplnému vyhynutí housenek v pokuse (obr. 4 D).

Diskuse

Z výsledku pokusu je zřejmo, že za předpokladu přítomnosti oportunistů ve střevě hmyzu je mechanické poškození střevní peritrofické membrány jedním z předpokladů vývoje patogenního procesu v organismu hmyzu. Ukazuje také, že uváděcím faktorem infekce v chovech musí být náhodné poškození střevní peritrofické membrány housenky ať již při přenášení ze staré na novou pastvu, nebo podáním potravy tak zaprášené, že poškozuje membránu. Tady ovšem musí být brán zřetel na rozsah poškození (rozsah napadené části výstelky) i na celou kondici housenky. Bylo pozorováno, že housenky některých japonských ras bourců, chované za těchže podmínek v našich insektariích, měly zcela malou mortalitu na septikemii v souvislosti s robustnější membránou.

Poškození střevní peritrofické membrány mechanickými prostředky nebo poškození střeva toxinem při klíčení spor není jediným způsobem, kterým se mikrobi dostávají do těla hmyzu přirozenou cestou. Z jiných pokusů, konaných s bekyní velkohlavou, *Lymantria dispar*, víme, že zkrmování rozmělněných těl housenek zašlých na polyedrii nenakaženým housenkám téhož druhu vedlo v značném procentu případů k hynutí housenek na septikemii. Při tom sama bakterie z mrtvých housenek neměla virulenci, potřebnou k vyvolání septikemie, ale působil tu zřejmě účinek chlupů housenek, pozřených s potřísněným listím, spolu s účinkem mikroba.

Konečně dalším faktorem, uvádějícím septikemii u hmyzu, je onemocnění jiným cizopasníkem. Tak při svých pokusech s infekcí housenek mikrosporidiemi jsme běžně pozorovali, že v první fázi, 3. až 5. den po nákaze, hyne značné množství housenek na septikemii. I když jsme použili spor mikrosporidie přímo z tkáně hostitele, tedy v čisté kultuře, byl průměr stejný. Bylo prokázáno, že planonty mikrosporidií, vylézající z otevřených spor a pronikající do sliznice střeva hmyzu, působí poškození peritrofické membrány i sliznice, kterými pronikají mikrobi a vyvolávají septikemii (obr. 5 F). Ježto pak nákaza mikrosporidií probíhá poměrně pomalu, než vyplní celé tukové těleso, a septikemie rychle, nacházíme housenky zašlé na septikemii již v době, kdy se mikrosporidie nedostala ani k sporulaci a tím není ani diagnostikována. Takto se onemocnění mikrosporidií projevuje v první fázi jako septikemie, vyvolaná normálně ve střevě housenky přítomnými oportunisty. Obdobně je možno si vysvětlit i řadu septikemií v přírodě, které jsou utajenými nákazami mikrosporidií a naopak si můžeme též vysvětlit poměrně menší frekvenci nákaz mikrosporidiemi. Podobně působí i nákaza červy nebo polyedrie.

Konečně posledním z uváděcích faktorů hmyzích septikemií podle našich zkušeností, o nichž bychom se chtěli zmínit, je zapaření housenek. Dochází k němu především v chovech, již méně v přírodě. Jakmile se na příliš malé ploše nebo v příliš malé uzavřené prostoře chová určité množství housenek, dojde k jejich zapaření. Poznáváme to hlavně podle zvlhlých stěn nádoby, zplihlejších chlupů housenek i podle typického zvadnutí rostlin za změny barvy listů. Když nyní housenky, které jsou normálně pohyblivé a životné, přeneseme (při sebelepších ostatních podmínkách) do nepřiměřeně velké prostory s hojností čerstvé a čisté nejlepší potravy, hynou přece jen postupně všechny na septikemii, vyvolanou dočasným poškozením zapařením (obr. 5 G). Pod pojmem zapaření musíme ovšem spojovat řadu činitelů fysikálních i chemických. Je to především zvýšená vlhkost a teplota, nedostatek kyslíku a přebytek kysličníku uhličitého a možná i řada dalších faktorů jako jsou:

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

nevhodná potrava, blízký styk jedinců atd. Na základě těchto pozorování musíme předpokládat, že bude možno působit i řadou chemických činidel, spojených se zmnožením mikrobů, těžké septikemie mezi hmyzem a tak likvidovat namnožení hmyzu na určitém areálu bez poškození ostatní biocenosy.

Souhrn

1. Zjistili jsme, že *Pseudomonas noctuarum* White je běžným původcem septikemií v chovech bource morušového u nás. Vyskytuje se normálně i ve střevě zdravých housenek bource morušového rasy „Maďarská žlutá" vedle *Micrococcus varians*, *Sarcina flava* a *Pseudomonas hydrophilla*.

2. Na základě studia patogenity *Ps. noctuarum* pro housenky bource jsme dospěli k názoru, že mikrobi jsou k hmyzu jen v poměru nepatogenních mikrobů a střevních „oportunistů", zasahujících až při poškození hmyzího těla. *Ps. noctuarum* působí při injekci do tělní dutiny bourců 100% mortalitu do 3 dnů, podán perorálně prakticky nepůsobí hynutí. Poškození peritrofické membrány střeva mechanickými prostředky (skelným prachem) dochází k rozvoji septikemie. Obdobně působí i zkrmování rozmělněných housenek, zašlých na polyedrii, hynutí na septikemii, která tu je pravděpodobně vyvolávána zraněním peritrofické membrány chlupy housenek.

3. Jako další činitel uvádějící septikemii uplatňuje se onemocnění jinými cizopasníky na př. mikrosporidií, případně zapaření housenek v těsných chovech.

(Obrazová příloha X)

Literatura

Aoki, K., Chigasaki, Y.: *Über die Pathogenität der sog. Sotto-Bacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen.* Mitt. d. Med. Fak. d. K. Univers. Tokyo 13 : 419, 1915.

Bergey's Manual of determinative bacteriology. Baltimore 1930, 1934, 1948.

Glaser, R. W.: *A bacterial disease of silkworms.* J. Bact. 9 : 339, 1924.

Hartman, E.: *A flacheria disease of silkworms caused by Bacillus bombysepticus n. sp.* Lignan Sci. J. 10 : 279, 1931.

King, K. M., Adkinson, N. J.: *The biological control factors of the immature stages of Euxoa ochrogaster Gn. in Saskatchewan.* Ann. Ent. Soc. Amer. 21 : 167, 1928.

Krasiľnikov, I. A.: *Opredeliteľ bakterij i aktinomycetov.* Moskva 1949.

Masera, E.: *Il Bacterium prodigiosum Flüge nella patologia del baco de seta.* Ann. staz. bacologica sper. Padova 47 : 90, 1936.

Masera, E.: *Flora microbica nelle nova di Bombyx mori.* Ann. R. Staz. bacologica sper., Padova 47 : 71, 81, 85, 1936.

Masera, E.: *Sul contenuto microbico intestinale del baco da seta e sull'etiologia della flacidezza.* Agricoltura delle Venezie, 1954.

Metalnikow, S., Chorine, V.: *The infectious diseases of Pyrausta nubilalis Hb.* Intern. Corn Borer Invest. Sci. Reports 1 : 41, 1928.

Michajlov, E. N.: *Šelkovodstvo.* Moskva 1950.

Paillot, A.: *Les maladies bactériennes des insectes.* Ann. Epiphyties phytogénétiques 8 : 95, 1922.

Paillot, A.: *L'infection chez les insectes.* Trevoux 1933.

Paillot, A.: *Un nouveau bacille sporulé pathogène pour le bombyx du murier: Bacillus bombycoides n. sp.* C. R. Acad. Agric. France 28 : 158, 1942.

Sawamura, S.: *Note on bacteria pathogenic to silkworms.* Tokyo Imp. Univ. Coll. Agric. Bulletin 7 : 105, 1906.

Steinhans, E. A.: *Insect microbiology.* New York 1947.

Steinhaus, E. A.: *Principles of insect pathology.* New York 1949.

Toumanoff, C.: *Étude comparative de la souche toxigène de Bacillus cereus var. sotto (Ishiwata) agent pathogène de la flacheria des vers à soie au Japon.* Ann. Inst. Pasteur 88 : 384, 1955.

Toumanoff, C., Vago, C., Cladiline, C.: *Recherches sur l'effet toxique de Bacillus cereus var. alesti vis-à-vis des vers à soie.* Ann. Inst. Pasteur 86 : 438, 1954.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Weiser, J., Veber, J.: *Možnosti biologického boje s přástevníčkem americkým (Hyphantria cunea Dr.).* Zool. ent. listy 3 : 55, 1954.
White, G. F.: *The cause of European Foulbrood.* Bur. Entomol., Circ. 157, 1912.
White, G. F.: *Cutworm septicaemia.* J. Agr. Research 26 : 487, 1923b.
White, G. F.: *Hornworm septicaemia.* J. Agr. Research 26 : 447, 1923a.
White, G. F.: *Potatoe beetle septicaemia, with the proposal of a new species of bacterium.* Proc. Ent. Soc. Washington 30 : 71, 1928.
White, G. F.: *Potatoe beetle septicaemia.* J. Agr. Research 51 : 223, 1935.

Септикемия тутового шелкопряда

Я. Вайсер и О. Лысенко

Резюме

Было установлено, что Pseudomonas noctuarum White является обычно возбудителем септикемии тутового шелкопряда, разводимого у нас. Pseudomonas noctuarum встречается нормально и в кишечнике здоровых гусениц тутового шелкопряда породы «Венгерский желтый» наряду с Micrococcus varians, Sarcina flava и Pseudomonas hydrophilla. Изучая патогенность P. noctuarum для гусеницы тутового шелкопряда, авторы пришли к заключению, что эти микробы являются для гусениц непатогенными кишечными «оппортунистами», которые активизируются только при нарушении целостности тканей насекомого. При инфекции в полость тела шелкопряда P. noctuarum вызывает 100% смертность в течение 3 дней. При введении через рот смертность практически не наблюдается. Септикемия развивается при нарушениях перитрофической оболочки кишечника механическими средствами (стеклянным порошком). Так же действует и корм, содержащий размельченных гусениц, погибших от полиэдрии. Септикемия вызывается здесь, вероятно, повреждением перитрофической оболочки щетинками гусениц. Другие факторы, вызывающие септикемию, это заражение другими паразитами, напр., микроспоридиями, или перегревание гусениц в тесных помещениях.

Silk-worm Septicaemia

J. Weiser and O. Lysenko

Summary

It was found that Pseudomonas noctuarum White is one of the common causes of septicaemia in silk-worms bred in Czechoslovakia. Pseudomonas noctuarum is also found normally in the intestinal flora of healthy silk-worm larvae of the „Hungarian Yellow" breed accompanied by Micrococcus varians, Sarcina flava and Pseudomonas hydrophila. As a result of the study of the pathogenicity of P. noctuarum for the larvae of the silk-worm, the authors came to the conclusion that bacteria have two types of relationship to the insects: nonpathogens causing no septicaemia in case of injection of the culture and „opportunists" living on the body and in the intestine of the insects and interfering as pathogens when the body of the insect is damaged by other factors (intoxication, physical factors, secondary infections by other microorganisms). When injected into the body cavity of the silk-worm, P. noctuarum causes 100 % mortality within three days; administered orally it has virtually no lethal effect. The damage of the intestinal peritrophic membrane by glass meal induced a septicaemia caused by P. noctuarum. Feeding of material from crushed caterpillars also causes death from septicaemia, probably as a result of mechanical injury to the peritrophic membrane by the hairs of the crushed larvae. Further causes of induced septicaemia in insects are damage of the gut of insects by other parasites, as microsporidia or helminths, or the overheating of the larvae when bred under overcrowded conditions.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 5

Nové antibiotikum BU 271

VLADIMÍR ŠEVČÍK, MILOSLAV PODOJIL, MARTA KYSELOVÁ a ALENA VRTIŠKOVÁ

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 10. 11. 1955

Z vysokomolekulárních antibiotik u aktinomycet byl v literatuře popsán mikromonosporin (Waksman se spol. 1942), aktinomycetin (Welsch 1937—1947), antibiotikum 2377 (anglický patent 719.230) a thermomycin (Schöne 1951). Tato antibiotika můžeme snadno odlišit od ostatních antibiotik nízkomolekulárních pomocí dialysy celofánovou membránou. Mikromonosporin a aktinomycetin jsou bílkovinného charakteru, antibiotikum 2377 není bílkovina, dává však positivní reakci s anthronem na uhlohydráty a u thermomycinu není udán bližší charakter molekuly.

V této práci uvádíme nové antibiotikum pravděpodobně bílkovinného charakteru, jehož přítomnost jsme vystihli u blíže neidentifikovaného kmene půdní aktinomycety a připravili jeho koncentrát.

Materiál a metody

Selekce původního kmene aktinomycety z půdního vzorku jsme dělali rozsevem na Petriho miskách na půdě: glukosa 1 %; škrob 1,5 %; kukuřičný extrakt 0,5 %; $(NH_4)_2SO_4$ 0,35 %; NaCl 0,5 %; $CaCO_3$ 0,5 %; pH bylo upraveno na 6,9 až 7,1. Jednotlivé kolonie aktinomycety jsme hodnotili metodou přelévacích testů, označovanou u nás též jako Kelner-Krasiľnikova metoda (Kelner 1949; Krasiľnikov 1950; Palečková a Nečásek 1954).

20 kolonií s maximální produkcí antibiotika na agarových plotnách (s největšími inhibičními zonami) jsme přeočkovali na šikmé bramborové agary. Po týdenní kultivaci při 28 °C jsme použili vyrostlých kultur na šikmých agarech ke kultivaci na třepačce. Odštěp aktinomycety s maximální produkcí na třepačce jsme vybrali pro druhý rozsev na Petriho miskách podobným způsobem jako původní kmen aktinomycety. Stejně jsme opakovali i další rozsevy na výše uvedené agarové půdě s kukuřičným extraktem, která svým velkým množstvím aminokyselin představuje vhodné prostředí pro biosyntesu bílkovin (molekula antibiotika). Jednotlivé odštěpy jsme uchovávali na šikmých bramborových agarech.

Laboratorní kultivace. Aktinomycetu jsme kultivovali na reciproké třepačce o 100 kmitech/min. s rozkmitem 7,5 cm, a to ve varných baňkách o obsahu 500 ml. V baňkách bylo po 80 ml výše uvedené půdy bez agaru. Kultivace probíhaly při 28 °C. Baňky byly očkovány buď 1 ml vodní suspense spor aktinomycety nebo 5 ml vegetativního inokula, připraveného 24 hodinovou kultivací na reciproké třepačce.

Titrace antibiotika. Antibiotikum jsme titrovali difusní metodou na agarových plotnách (mísách) podobným způsobem jako streptomycin. Jako testovacího mikrobu jsme používali *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ševčík 1954).

Za jednotku antibiotika BU 271 je považováno množství antibiotika, jehož inhibiční zona odpovídá při difusní metodě velikosti inhibiční zony způsobené jedním mcg base streptomycinu. Křivka antibiotika BU 271 při mikrobiologických titracích odpovídá standardní křivce streptomycinu v rozmezí 1—8 j./ml. Při vyšších koncentracích je křivka antibiotika BU 271 poněkud nižší než standardní křivka streptomycinu. Při titracích ředíme proto vzorek antibiotika přibližně na koncentraci 1—8 j. S./ml (streptomycinových jednotek/ml).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Příprava surového preparátu. Antibiotikum BU 271 můžeme adsorbovat na aktivní uhlí při kyselé, neutrální i zásadité reakci (pH 2, 7 a 9), eluce z uhlí okyseleným methanolem nebo směsí methanolu a benzenu (1 : 1), však nebyla nikdy příznivá. Organická rozpouštědla antibiotikum částečně rozrušují.

Protože nebyla výhodná ani adsorpce na aktivní uhlí ani extrakce organickými rozpouštědly, byly surové preparáty antibiotika připraveny lyofilisací dialysovaných filtrátů kultury aktinomycety. 250 ml čirého filtrátu kultury o pH 7,19 (500 j. S./ml) bylo dialysováno proti destilované vodě při 2 °C. Po 48 hod. byl roztok prakticky zbaven elektrolytů. Po lyofilisaci roztoku jsme získali 370 mg bělavého prášku s účinností 410 j. S./ml. Podobným způsobem jsme připravili z filtrátu kultury s účinností 980 j. S./ml surový preparát s účinností 1150 j. S./mg. Od dalšího čištění surového preparátu jsme upustili pro jeho značnou nestálost.

Elektroforesa. K elektroforese antibiotika BU 271 jsme použili papíru Whatman č. 1 (7,5 × 30 cm), a to jednak v 0,05 M octanovém ústoji pH 5,0 (250 V, 4,5 mA, 6 a 20 hod.), a dále v 0,0125 M fosfátovém ústoji pH 7,0 (400 V, 0,1 mA, 3 hod.) a v 0,0125 M fosfátovém ústoji pH 8 (250 V, 3 mA, 4 hod.). Jako kontroly pro endosmosu jsme použili chloramfenikolu a želatinového hydrolysátu.

Výsledky a diskuse

Nové antibiotikum BU 271 jsme získali z kmene půdní aktinomycety, která je v naší sbírce uvedena pod číslem 271. Kolonie aktinomycety mají na agarových půdách bělavý mycel s nažloutlými sporami. Mycel je vespod rezavé barvy. Difundující pigment nevytváří.

Isolovaný kmen aktinomycety produkoval při kultivaci na třepačce na výše uvedené půdě 43 j. S./ml. Rozsevem na agarových půdách byly získány odštěpy s maximální produkcí 460 j. S./ml. Při dalším přeočkovávání na šikmých bramborových agarech však produkce antibiotika velmi rychle poklesla.

Druhým rozsevem jsme získali odštěpy (20), z nichž asi polovina (9) antibiotikum na třepačce neprodukovala, ale čtvrtina kmenů (5) měla velmi příznivou maximální produkci (kolem 1000 j. S./ml), která však nebyla příliš stabilní. Velké rozdíly v produkci byly pozorovány v jednotlivých dnech submersní kultivace, mezi původními kulturami a propagacemi, dále produkce antibiotika značně kolísala při očkování téhož kmene v různých týdnech, což bylo pravděpodobně způsobeno malou stabilitou kmene.

Dalším rozsevem vybraného, silně produkčního kmene (kolem 1000 j. S./ml při kultivaci na třepačce), jsme získali 28 odštěpů, z nichž již všechny produkovaly antibiotikum při kultivaci na třepačce. Asi polovina odštěpů měla již velmi příznivou produkci (1000—2000 j. S./ml), produkce však byla stále ještě dosti kolísavá, i když se kmen postupně stabilisoval. Stabilnější kmeny byly získány až po dalším rozsevu, kdy při vyhodnocování na agarových plotnách se velikosti inhibičních zon u jednotlivých odštěpů od sebe příliš nelišily.

Očkování aktinomycety vegetativním inokulem 24 hod. starým se projevilo velmi příznivě na produkci antibiotika. Ve všech případech bylo pozorováno velmi silné, v ojedinělých případech až čtyrnásobné zvýšení produkce antibiotika. Pokud na př. u původních kultur, očkovaných sporovým inokulem, byla maximální produkce antibiotika po 6 dnech kultivace 530—730 j. S./ml, pohybovala se maximální produkce antibiotika u kultur očkovaných vegetativním inokulem po 6denní kultivaci v rozmezí 980—1050 j. S./ml.

Při očkování vegetativního inokula do podobných půd, na kterých bylo připraveno vegetativní inokulum, avšak s jinými zdroji uhlíku (sacharosa, laktosa), nebo do půd se sojovou moukou, nastalo ve všech případech zřetelné snížení produkce antibiotika.

Antibiotikum BU 271 je stálejší pouze při snížené teplotě. Při 2 °C je antibiotikum stá.é po několik týdnů. Při laboratorní teplotě je rychle rozrušováno při kyselé, neutrální i zásadité reakci již po 24 hod. Varem po 15 min. je rozrušeno při všech zkoušených pH (2,0—7,0—9,0).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Antibiotikum je účinější při alkalické reakci (pH 7,5 až 8,0), 50% krevním serem se snižuje účinnost na polovinu. Organická rozpouštědla antibiotikum rozrušují.

Antibiotikum nedialysuje celofánovou membránou a skvrna antibiotika na papírovém elektroforegramu se barví bromfenolovou modří, což ukazuje na pravděpodobný bílkovinný charakter molekuly.

Antibiotikum BU 271 působí zvláště na grampositivní bakterie. Na různé druhy grampositivních bakterií působilo většinou v koncentraci 1—8 j./ml, kdežto na různé druhy gramnegativních bakterií nepůsobilo ani v koncentraci 100 j./ml. Zvláště silně působilo na *Mycobacterium phlei*, na které ve srovnání s účinkem na jiné bakterie působilo více než streptomycin.

Antibakterijním spektrem a velikou molekulou se podobá antibiotikum BU 271 mikromonosporinu (Waksman se sp. 1942, Welsch 1947), od něhož se však liší stabilitou, způsobem isolace (nevysráží se po přidání 50—90 % ethanolu nebo acetonu) a zbarvením. Při zahřívání filtrátu kultury s mikromonosporinem po 60 min. na 100 °C se rozruší asi dvě třetiny antibiotika, kdežto při zahřívání roztoku antibiotika BU 271 na 100 °C je všechno antibiotikum rozrušeno již po 15 min. Zatím co je mikromonosporin spojen s oranžovým pigmentem, je antibiotikum BU 271 bezbarvé.

LD_{50} u myší při intravenosní aplikaci preparátu s účinností 1150 j./mg bylo 45 mg/kg, což odpovídá 1035 j./myš.

Souhrn

Antibiotikum BU 271 bylo získáno z blíže neurčeného druhu aktinomycety, označené čís. 271. Antibiotikum je bezbarvá látka, nedialysuje celofánovou membránou a skvrna antibiotika na papírovém elektroforegramu se barví bromfenolovou modří. Antibiotikum působí převážně na grampositivní bakterie.

Antibakterijním spektrem a velikou molekulou se podobá mikromonosporinu, od něhož se však liší stabilitou, způsobem isolace (nevysráží se po přidání ethanolu nebo acetonu) a zbarvením. Varem po 15 min. se úplně rozruší.

LD_{50} u myší při intravenosní aplikaci bylo 45 mg/kg.

Surové preparáty antibiotika připravil RNDr L. Novotný v Chemickém ústavu ČSAV, za což mu zde děkujeme. Dále děkujeme za technickou spolupráci M. Vávrové a E. Nedbalové.

Literatura

Anglický patent č. 719.230 z 1. 12. 1954.

Kelner, A.: *Studies on the genetics of antibiotic formation: the induction of antibiotic-forming mutants in Actinomycetes.* J. Bact. 57 : 73, 1949.

Krasiľnikov, N. A.: *Aktinomicety — antagonisty i antibiotičeskije veščestva.* Moskva 1950.

Palečková, F., Nečásek, J.: *Přelévací metoda pro selekci produkčních kmenů Streptomyces griseus.* Preslia 26 : 295, 1954.

Schöne, R.: *An antibiotic which inhibits Corynebacterium diphtheriae produced by the S-form of Streptomyces thermophilus.* Antib. Chemother. 1 : 176, 1951.

Ševčík, V.: *Úvod do biochemické analysy mikroorganismů.* Praha 1954.

Waksman, S. A., Horning, E. S., Welsch, M., Woodruff, H. B.: *Distribution of antagonistic Actinomycetes in nature.* Soil Sci. 54 : 281, 1942.

Welsch, M.: *Influence de la nature du milieu de culture sur la production de lysines par les Actinomyces.* C. R. Soc. Biol. 126 : 244, 1937.

Welsch, M.: *De quelques propriétés du principe bactériolytique des Actinomyces.* C. R. Soc. Biol. 126 : 247, 1937.

Welsch, M.: *Mise au point d'une technique néphélométrique pour l'étude de la mycolyse.* C. R. Soc. Biol. 128 : 795, 1938.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Welsch, M.: *Dosage néphélometrique du principe bactériolytique des Actinomyces.* C. R. Soc. Biol. 128 : 1172, 1938.
Welsch, M.: *Inactivation par la chaleur du principe bactériolytique des Actinomyces.* C. R. Soc. Biol. 128 : 1175, 1938.
Welsch, M.: *Mise au point d'une technique néphélometrique pour l'étude de la mycolyse. II. Influence de la réaction du milieu sur le trouble des suspensions microbienns.* C. R. Soc. Biol. 130 : 797, 1939a.
Welsch, M.: *De l'inactivation du principe bactériolytique des Actinomyces par les rayons ultra-violets.* C. R. Soc. Biol. 131 : 1296, 1939b.
Welsch, M.: *Phénomènes d'antibiose chez les Actinomycètes.* Gembloux 1947.

Новый антибиотик BU 271

В. Шевчик, М. Подоил, М. Киселова и А. Вртишкова

Резюме

Антибиотик BU 271 был нами получен из точнее не определенного вида актиномицета, обозначенного нами № 271. Антибиотик BU 271 это бесцветное вещество, которое не диффунцирует из коллодийного мешочка. Он действует преимущественно на грам-положительные бактерии. По своему антибактерийному спектру и по размерам молекулы он приближается к микромоноспорину, от которого отличается однако своей устойчивостью и по способу изоляции (он не осаждается после прибавления этилового спирта или ацетона), а также по своей окраске. Кипячение в течение 15 мин. его полностью разрушает. LD_{50} для мышей при внутривенном введении составляла 45 мг/кг.

The New Antibiotic BU 271

V. Ševčík, M. Podojil, M. Kyselová and A. Vrtišková

Summary

Antibiotic BU 271 was obtained from a strain of Actinomyces labelled No. 271, but otherwise not more closely identified. The antibiotic is a colourless, undialysable substance and acts chiefly on gram-positive bacteria. Its antibacterial spectrum and the size of its molecules resemble those of micromonosporine, but it differs from the latter by its stability, the method of isolation (it is not precipitated after the addition of ethanol or acetone) and by its colouring. It is completely destroyed by boiling for 15 minutes. The intravenous LD_{50} for mice was 45 mg./kg.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 1. (1956) — č. 5

Dynamika množenia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách

JÁN SZÁNTÓ a NAĎA VALENTOVÁ

Virologický ústav ČSAV, Bratislava

Došlo 17. 5. 1956

Pre porozumenie vzniku infekcie vírusom chrípky je potrebné poznať javy, ktoré sa odohrávajú pri styku vírusu s vnímavými bunkami a spôsob, ako prebieha rozmnožovanie vírusu.

Aby sme poznali proces infekcie, pestujeme vírus chrípky na vhodných objektoch a pozorujeme dynamiku množenia vírusu, ktorá poskytuje predstavu o niektorých stupňoch priebehu infekcie. Podľa objektu, na ktorom robíme pokusy, usudzujeme, do akej miery sa dajú výsledky pozorovaní aplikovať na vznik infekcie u človeka. Pritom sa oboznamujeme aj s vlastnosťami vírusu samotného.

Doteraz máme vedomosti o dynamike množenia vírusu chrípky na kuracích embryách, deembryovaných vajíčkach a v suspendovaných tkanivových kultúrach. Tieto skúsenosti chceme porovnať s rastovými krivkami vírusu, získanými z tkanivových kultúr v otáčavých skúmavkách pri sledovaní dvoch vlastností vírusu: infekčnosti a hemaglutinácie.

Cieľom našej práce bolo zistiť, aký vplyv majú určité podmienky, ako druh tkaniva a zloženie výživnej tekutiny, na rozmnožovanie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach a či sú rozdiely v množení vírusu chrípky typu A, kmeňa PR 8 a vírusu chrípky kmeňa A_1. V práci podávame tiež výsledky pokusov, v ktorých sme zisťovali infekčné titre vírusu chrípky titráciou infekčného materiálu v suspendovaných tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách.

Materiál a metódy

Tkanivové kultúry v otáčavých skúmavkách (tzv. rozmnožovacie tkanivové kultúry) pre pozorovanie vzrastovej krivky vírusu chrípky. Tkanivo pozostávalo z rozstrihaných chorionalantoických blán 10—11dňových kuracích embryí alebo z rozstrihaných 10dňových kuracích embryí zbavených hlavy a končatín. Tkanivo sme preplachovali fyziologickým roztokom, kým roztok bol celkom číry. Do jednej skúmavky do kohútej plazmy sme vkladali 30—40 explantátov. Výživná tekutina pozostávala zo 70% Geyovho roztoku, 20% kuracieho embryonálneho extraktu 50% a 10% neinaktivovaného konského séra (zložité výživné prostredie) alebo len z Geyovho roztoku (jednoduché výživné prostredie). Na jednu skúmavku sme pridali 1,5 ml výživnej tekutiny a 0,1 ml riedeného vírusu z alantoickej tekutiny. Kultúry sa inkubovali pri 36 °C v otáčavom bubni.

Vírusy. Vzrastovú krivku vírusu chrípky v tkanivových kultúrach sme zisťovali u laboratórneho kmeňa PR 8 a u kmeňa A_1 Čs 1 - 1951, ktorý prekonal 33 pasáží na kuracích emboyách, 10 pasáží v suspendovaných tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán a znovu jednu pasáž na kuracích embryách. Infikovanú alantoickú tekutinu sme riedili Geyovým roztokom, na jednu skúmavku sme pridali 0,1 ml suspenzie vírusu a 1,5 ml výživnej tekutiny súčasne so založením kultúr. Aby sme zistili presné množstvo vírusu, ktoré sme pridali ku tkanivovým kultúram, určili sme infekčný titer pridanej výživnej tekutiny, obsahujúcej vírus, titráciou na kuracích embryách a hodnotu, ktorú sme dostali, považovali sme za východziu, t. j. infekčný titer po 0 hod.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

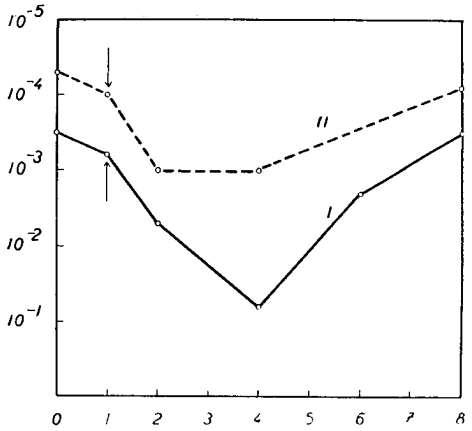
Titrácia vírusu chrípky z rozmnožovacích tkanivových kultúr na kuracích embryách. Pre zistenie vzrastovej krivky vírusu chrípky v rozmnožovacích kultúrach sme odoberali tekutinu z dvoch skúmaviek v štvorhodinových alebo kratších intervaloch, ako to uvádzame vo výsledkoch pokusov. Odobratú tekutinu sme riedili ústojným bujónom a u každého riedenia sme naočkovali štyri 10—12 dňové kuracie embryá intraalantoicky po 0,1 ml. Vajíčka sa inkubovali 48 hod. pri 35,5 °C. Infekčný titer sme vypočítali podľa Reed-Muencha (cit. Blaškovič a spol. 1954) akumulačným výpočtom.

Titrácia vírusu chrípky z rozmnožovacích tkanivových kultúr v suspendovaných tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán v otáčavých skúmavkách (tzv. titračné tkanivové kultúry). Po obdržaní dobrých výsledkov pri titrácii infikovaných alantoických tekutín u vírusov chrípky A PR 8, A_1 Čs 1 - 1951, A_1 Čs 3 - 1954 a B Čs 1 - 1949 v titračných tkanivových kultúrach podľa prispôsobenej Horváthovej metódy (1954) a súčasne na kuracích embryách (výsledky uvádzame v tab. 1), použili sme túto metódu aj pre titráciu infikovanej tekutiny z rozmnožovacích tkanivových kultúr. Tkanivo v titračných kultúrach pozostávalo z dobre premytých kúskov chorionalantoických blán 10—12 dňových kuracích embryí. Na jednu skúmavku sme pridali 0,1 ml suspenzie tkaniva, 0,9 ml výživnej tekutiny a 0,1 ml z každého riedenia infikovanej tekutiny z rozmnožovacích kultúr. Vírus sme riedili vo výživnej tekutine, pozostávajúcej z fosfátového ústojného roztoku, glukozolu a 0,2 % vaječného bielku (Horváth 1954). Na každé riedenie vírusu sme použili štyri skúmavky. Kultúry sa inkubovali 72 hod. v otáčavom bubni pri 36 °C a u B kmeňa pri 32 °C. Po tejto dobe sme pridali k 0,5 ml tekutiny z každej skúmavky 0,5 ml 0,5 % kohútich krviniek. Aglutináciu kohútich krviniek sme odčítali za 90 min. pri izbovej teplote. Infekčný titer sme vypočítali podľa Reed-Muencha (cit. Blaškovič a spol. 1954). Súčasne sme robili titráciu aj na 10—12 dňových kuracích embryách spôsobom, ako je to vyššie opísané.

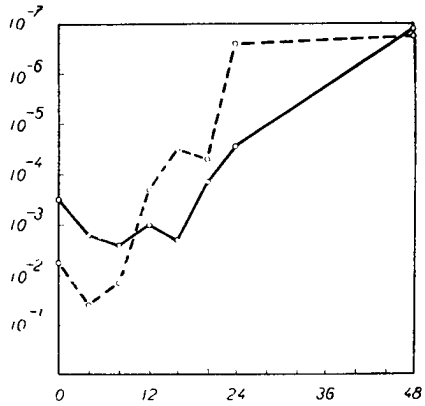
Zistenie hemaglutinínov v tekutom prostredí rozmnožovacích tkanivových kultúr. 0,5 ml dvojnásobných riedení infikovanej tekutiny z rozmnožovacích kultúr po jednotlivých časových intervaloch vo fyziologickom roztoku sme zmiešali s 0,5 ml 0,5 % kohútich krviniek. Aglutináciu krviniek sme odčítali za 90 min. pri izbovej teplote. Hemaglutinačný titer udáva to riedenie tekutiny z kultúr, ktoré ešte zapríčinilo aglutináciu krviniek.

Výsledky

Vzrastové krivky vírusu chrípky, kmeňa PR 8 v rozmnožovacích tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán. Dynamiku množenia vírusu chrípky, kmeňa PR 8 v prvých hodinách inkubácie sme sledovali určením vzostupu infekčného titra a hemaglutinačnej schopnosti vírusu v tekutom prostredí kultúr. Do rozmnožovacích tkanivových kultúr z chorionalantoických blán 10—11dňových kuracích zárodkov sme pridávali výživnú tekutinu dvojakého druhu, aby sme zistili, aký vplyv má zloženie tekutého prostredia kultúr na priebeh rozmnožovania vírusu.



Obr. 1. Priebeh adsorpcie a uvoľňovanie vírusu chrípky, kmeňa PR 8, z buniek v rozmnožovacích tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany s jednoduchým výživným prostredím. o—o 1. pokus, o— — —o 2. pokus. ↑ výmena tekutého prostredia kultúr.



Obr. 3. Vzrastové krivky vírusu chrípky, kmeňa PR 8, v rozmnožovacích tkanivových kultúrach zo zmiešaných tkanív celého kuracieho embrya. o-o zložité výživné prostredie (priemerné hodnoty 4 pokusov), o— — —o jednoduché výživné prostredie (priemerné hodnoty 2 pokusov).

Os x: čas v hod., os y: výška infekčného titra v log.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

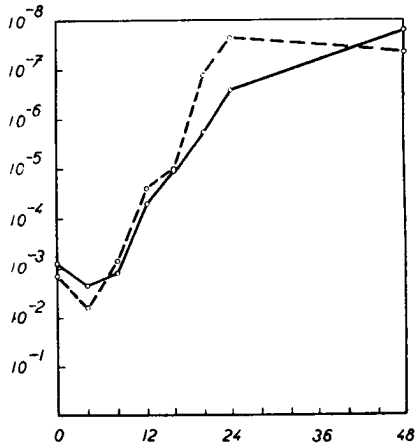
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

V jednej sérii pokusov pozostávalo tekuté prostredie kultúr z Geyovho roztoku, kuracieho embryonálneho extraktu a konského séra (zložité výživné prostredie) a v druhej sérii pokusov pozostávalo tekuté prostredie kultúr len z Geyovho roztoku (jednoduché výživné prostredie).

Priebeh rozmnožovania vírusu v tkanivových kultúrach len v Geyovom roztoku prvých 8 hod. inkubácie uvádzame na obr. 1. Uvádzame výsledky z dvoch pokusov. Po 1 hod. inkubácii sa o málo zmenší množstvo voľného neadsorbovaného vírusu v tekutom prostredí kultúr. Tu sme súčasne odstránili aj Geyov roztok spolu s voľným vírusom, kultúry sme prepláchli fyziologickým roztokom a pridali sme čerstvý Geyov roztok bez vírusu. V ďalších intervaloch sme znovu titrovali tekuté prostredie kultúr na obsah vírusu. I po prepláchnutí kultúr fyziologickým roztokom ostáva v skúmavkách dosť značné množstvo vírusu, ktoré je adsorbované na povrch buniek a možno aj na plazmu, vystielajúcu vnútornú stenu skúmavky. Takto povrchove adsorbovaný vírus sa odplaví potom do Geyovho roztoku a adsorbcia vírusu na bunky i vnútrobunkové množenie vírusu pokračuje ďalej. Uvoľňovanie vírusových častíc z buniek do tekutého prostredia nastáva po 4 hod. inkubácii. Infekčné titre sa teda medzi 4. a 8. hod. zvyšujú, takže po 8 hod. inkubácii dosahujú alebo skoro dosahujú hodnoty zistené pri titrácii v 0 hod.

Medzi 4. a 8. alebo 8. a 12. hod. uvoľní sa už také množstvo vírusu, že infekčné titre po 8. alebo 12. hod. sú už vyššie ako po 0 hod. Ďalej sa vírus stále uvoľňuje do tekutého prostredia kultúr a po 48 hod. inkubácii (po ktorú dobu sme robili pokusy) sme dosiahli najvyššie infekčné titre. V niektorých pokusoch sa dosiahol najvyšší infekčný titer už po 24 hod.; v ďalšom období sa veľmi nemenil alebo pomaly klesal. Toto sme pozorovali hlavne v kultúrach len s Geyovým roztokom.

Zloženie výživnej tekutiny kultúr nemá vplyv na rozmnožovanie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany, ako to vyplýva z obr. 2. Krivky predstavujú priemerné hodnoty troch pokusov so zložitým výživným prostredím, lebo troch pokusov s jednoduchým výživným prostredím.



Obr. 2. Vzrastové krivky vírusu chrípky, kmeňa PR 8, v rozmnožovacích tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany. o—o zložité výživné prostredie (priemerné hodnoty 3 pokusov), o— — —o jednoduché výživné prostredie (priemerné hodnoty 3 pokusov).
Osa x: čas v hod.,
os y: výška infekčného titra v log.

Keď sa pridá väčšie množstvo vírusu chrípky ku kultúram, tekuté prostredie obsahuje mnoho neadsorbovaných vírusových častíc (po 4 hod. bol infekčný titer $10^{-4,5}$). V priebehu kultivácie vírusu nastáva relatívne malé rozmnoženie vírusových častíc, takže infekčné titre vírusu sa zvýšia relatívne menej než v pokusoch, v ktorých sme pridali ku kultúram viac zriedené inokulum. V tomto pokuse sa zvýšil infekčný titer z $10^{-4,5}$ po 24 hod. inkubácii na $10^{-5,5}$ a po 48 hod. na $10^{-6,33}$.

Rozmnožovanie vírusu chrípky v kultúrach z chorionalantoických blán sme zisťovali aj pomocou dôkazu hemaglutinínov priamo v tekutom prostredí kultúr. Prvé hemaglutiníny môžeme dokázať po 20—24 hod. inkubácii. Do tohto obdobia nemôžeme hemaglutinačnou skúškou dokázať prítomnosť vírusu v tekutom prostredí kultúr. Výsledky podávame zo šiestich pokusov. V jednotlivých pokusoch bolo

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

množstvo hemaglutinínov po 20 hod. 0—1 : 4, po 24 hod. 0—1 : 64, po 48 hod. 1 : 32—1 : 128 a po 72 hod. 1 : 32—1 : 256.

Vzrastové krivky vírusu chrípky, kmeňa PR 8 v rozmnožovacích tkanivových kultúrach zo zmiešaných tkanív celého kuracieho embrya. V tejto sérii pokusov sme použili rozmnožovacie kultúry zo zmiešaných tkanív celého kuracieho embrya. I u týchto tkanivových kultúr sme sledovali, aký vplyv má zloženie výživnej tekutiny na priebeh rozmnožovania vírusu. Používali sme zložité a jednoduché výživné prostredie toho istého zloženia ako v kultúrach len z chorionalantoických blán.

Po 4 hod. zisťujeme nižší infekčný titer vírusu ako po 0 hod. následkom adsorbcie a vnútrobunkového rozmnožovania vírusu. Niekedy zisťujeme menšie množstvo vírusu v tekutom prostredí kultúr až po 8 hod. Ďalší priebeh vzrastovej krivky vírusu závisí od zloženia výživného prostredia.

V tkanivových kultúrach so zložitým výživným prostredím sa hodnoty infekčných titrov podstatne nemenia medzi 4, resp. 8 hod. a 16, resp. 20 hod. inkubácie, takže do tohto času, t. j. do 16—20 hod. inkubácie sú infekčné titre nižšie ako pri začiatku pokusu, t. j. pri 0 hod.

V tkanivových kultúrach s jednoduchým výživným prostredím sa vzrastové krivky vírusu podobajú vzrastovým krivkám vírusu v tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán. Tu sa uvoľní už medzi 8—12 hod. inkubácie toľko vírusu do tekutého prostredia, že jeho titer prevýši množstvo vírusu pridaného ku kultúram.

Výsledky tejto série pokusov vidíme na obr. 3. Krivky predstavujú priemerné hodnoty štyroch pokusov so zložitým výživným prostredím, lebo dvoch pokusov s jednoduchým výživným prostredím.

Aj v tkanivových kultúrach zo zmiešaných tkanív celých kuracích embryí ostáva mnoho voľného neadsorbovaného vírusu v tekutom prostredí kultúr, ak pridáme málo zriedené inokulum. V tomto prípade tiež nastáva relatívne malé zvýšenie množstva vírusu oproti kultúram, ku ktorým sa pridalo viac zriedené inokulum. V pokuse s málo zriedeným inokulom bol infekčný titer po 4 hod. $10^{-4,87}$ a po 48 hod. bol $10^{-6,50}$, kdežto v pokuse so silno zriedeným inokulom bol infekčný titer po 4 hod. $10^{-0,56}$, po 8 hod. $10^{-1,0}$ a po 48 hod. bol $10^{-6,50}$.

Keď sme zisťovali rozmnožovanie vírusu chrípky v takýchto tkanivových kultúrach pomocou hemaglutinačných skúšok, vtedy prvé hemaglutíny sme dokázali až po 24 hod. inkubácii. V šiestich pokusoch sme nemohli dokázať medzi 0—24 hod. žiadne hemaglutiníny v tekutom prostredí kultúr, po 48 hod. boli hemaglutinačné titre v jednotlivých pokusoch 1 : 4—1 : 32 a po 72 hod. 1 : 16—1 : 64.

Vzrastové krivky vírusu chrípky, kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 v rozmnožovacích tkanivových kultúrach. Priebeh rozmnožovania vírusu chrípky, kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 sme zisťovali v tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán a zo zmiešaných tkanív z celého kuracieho embrya. Výživná tekutina pozostávala z Geyovho roztoku. Kmeň A_1 Čs 1 - 1951 po predchádzajúcich pasážach na kuracom zárodku a v tkanivových kultúrach sa vrátil na kurací zárodok; v pokusoch sú výsledky z jeho novej prvej vajcovej pasáže. S každým druhom tkaniva sme spravili tri pokusy.

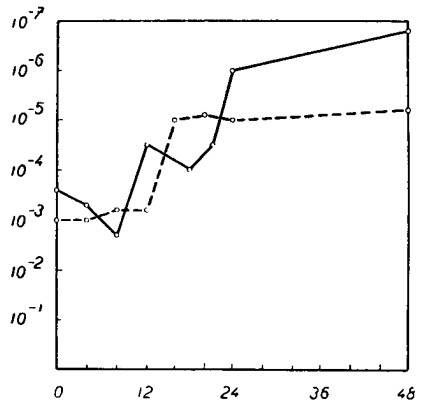
Pri použití tkanivových kultúr z chorionalantoickej blany začína rozmnožovanie vírusu po 8 hod. a množstvo vírusu uvoľneného z buniek do tekutého prostredia kultúr prevýši infekčný titer inokulovaného vírusu. V tkanivových kultúrach z celého embrya sa uvoľní väčšie množstvo vírusu až medzi 12—16 hod. alebo aj o niečo neskoršie.

Priebeh rozmnožovania kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 v obidvoch druhoch tkanivových kultúr je veľmi menlivý a menej pravidelný ako u laboratórneho kmeňa PR 8 typu A. Preto neuvádzame na obr. 4 priemerné hodnoty rastových kriviek, ale len výsledky z jednoho pokusu z každej série pokusov.

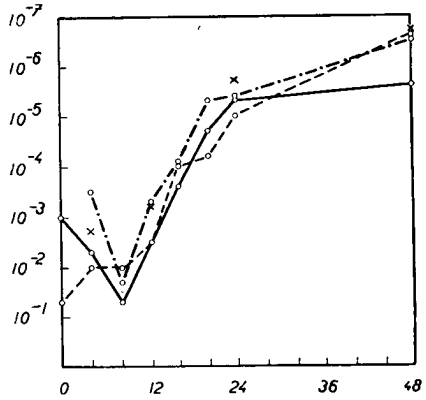
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

V tkanivových kultúrach z celého embrya sú podstatne nižšie infekčné titre po 24 a 48 hod. inkubácii ako v tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany. Tieto veľké rozdiely vysvetľujeme tým, že sme použili síce tú istú alantoickú tekutinu, ale v pokuse z celého embrya o niečo neskoršie, takže infekčný titer alantoickej tekutiny klesol z $10^{-8,75}$ na $10^{-7,50}$.



Obr. 4. Množenie vírusu chrípky, kmeňa A_1 Čs 1 - 1951, v rozmnožovacích tkanivových kultúrach s jednoduchým výživným prostredím. o—o tkanivové kultúry z chorionalantoickej blany, o— — —o tkanivové kultúry zo zmiešaných tkanív celého kuracieho embrya.



Obr. 5. Titrácia vírusu chrípky, kmeňa PR 8, z rozmnožovacích tkanivových kultúr v titračných tkanivových kultúrach a na kuracích embryách. 1. pokus: o—o titrácia vírusu v titračných kultúrach, o—·—o titrácia vírusu na kuracích embryách. 2. pokus: o— — —o titrácia vírusu v titračných kultúrach, × titrácia vírusu na kuracích embryách.

Os x: čas v hod., os y: výška infekčného titra v log.

Rovnako jako u kmeňa PR 8, aj u kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 sme zisťovali prítomnosť hemaglutinínov priamo v tekutom prostredí rozmnožovacích kultúr počas 72 hod. inkubácie. U kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 sa nám počas tohto obdobia inkubácie nepodarilo dokázať hemaglutinačnou skúškou prítomnosť vírusu v kultúrach.

Titrácia vírusov chrípky v titračných tkanivových kultúrach. Vzostup infekčných titrov vírusu chrípky v priebehu pestovania v rozmnožovacích tkanivových kultúrach sme určovali titráciou infekčného materiálu z kultúr na kuracích embryách. Nevýhodou tejto metódy je, že sa spotrebuje veľké množstvo vajíčok. Preto sme sa snažili vypracovať metódu titrácie vírusov chrípky v tkanivových kultúrach.

Tab. 1. Titrácia alantoických tekutín infikovaných vírusmi chrípky v titračných tkanivových kultúrach a na kuracích embryách. IT = infekčný titer. K. E. — IT na kuracích embryách. T. K. — IT v titračných tkanivových kultúrach.

Druh titrácie / Vírus	IT		IT		IT		IT	
	K. E.	T. K.	K. E.	T. K.	K. E.	T. K.	K. E.	T. K.
PR 8	$10^{-8,0}$	$10^{-7,66}$	$10^{-8,33}$	$10^{-7,50}$	$10^{-8,66}$	$10^{-8,0}$		
A_1 Čs 1 - 1951	$10^{-8,33}$	$10^{-6,33}$	$10^{-8,23}$	$10^{-6,0}$	$10^{-8,25}$	$10^{-5,66}$		
A_1 Čs 3 - 1954	$10^{-6,50}$	$10^{-7,23}$	$10^{-7,16}$	$10^{-6,50}$	$10^{-7,66}$	$10^{-7,49}$	$10^{-7,50}$	$10^{-7,0}$
B Čs 1 - 1949	$10^{-7,0}$	$10^{-6,0}$	$10^{-7,0}$	$10^{-5,33}$	$10^{-7,0}$	$10^{-6,50}$		

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Na titrácie sme použili suspendované tkanivové kultury z chorionalantoických blán, ktoré sme zakladali do otáčavých skúmaviek. Najprv sme vyskúšali túto metódu na paralelných titráciách vírusov chrípky v titračných tkanivových kultúrach a na kuracích embryách. Výsledky týchto pokusov uvádzame v tab. 1.

Titrácie sme robili s kmeňom PR 8, kmeňom A_1 Čs 1 - 1951, tak isto pasážovaným, ako to uvádzame v pokusoch s rozmnožovacími kultúrami, len z druhej, štvrtej a siedmej vajcovej pasáže po naočkovaní vírusu z kultúr, s kmeňom A_1 Čs 3 - 1954 z 9., 11. a 12. vajcovej pasáže a s vírusom typu B Čs 1 - 1949 zo 49. a 50. pasáže na kuracích embryách.

Infekčné titre vírusov chrípky, získané rozmnožovaním vírusov v titračných tkanivových kultúrach sú nižšie ako pri titrácii na kuracích embryách. Najhoršie výsledky sme dosiahli s kmeňom A_1 Čs 1 - 1951. V jednom pokuse s kmeňom A_1 Čs 3 - 1954 bol infekčný titer, zistený pomocou tkanivových kultúr, vyšší ako titer zistený na kuracích embryách, ale bežne sú vždy vyššie titre na kuracích embryách.

Na základe týchto výsledkov sme spravili dva pokusy, v ktorých sme zisťovali rozmnožovanie kmeňa PR 8 v rozmnožovacích tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán titráciou infekčného materiálu v titračných kultúrach. Pre kontrolu sme robili aj titrácie na kuracích embryách. Výsledky sú na obr. 5. V prvom pokuse prebiehajú obidve krivky získané podľa dvoch metód titrácie skoro rovnobežne. V týchto pokusoch boli infekčné titre získané titráciou infekčného materiálu z rozmnožovacích kultúr na kuracích embryách vyššie ako infekčné titre získané titráciou vírusu v titračných tkanivových kultúrach. Keď sme vypočítali priemerný rozdiel medzi týmito dvoma krivkami, dostali sme hodnotu 0,63 log. V druhom pokuse bol priemerný rozdiel 0,58 log medzi hodnotami získanými titráciou vírusu v titračných kultúrach a na kuracích embryách.

Prežívanie vírusu chrípky v Geyovom roztoku pri + 4 °C. V niektorých pokusoch s rozmnožovaním vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme dosiahli už po 4 hod. inkubácii vyššie infekčné titre ako po 0 hod. Tieto rozdiely boli niekedy značné, pričom sme nemohli predpokladať, že by do 4 hod. nastalo z buniek tak veľké uvoľnenie už rozmnožených vírusových častíc do tekutého prostredia. Pracovný postup bol tento: vírus, ktorý sme pridávali ku kultúram, sme riedili Geyovým roztokom. Vírus, ktorým sme infikovali tkanivové kultúry, sme potom držali v chladničke a titrovali sme ho súčasne s tekutinou odobratou z kultúr po 4 hod. inkubácie v termostate. Šlo o to zistiť, či sa nedeje dačo s vírusom držaným v Geyovom roztoku v chladničke počas doby 4 hod.

Pripravili sme preto takú istú suspenziu vírusu chrípky, kmeňa PR 8 v Geyovom roztoku, akou sme infikovali tkanivové kultúry. Suspenziu sme držali v chladničke pri + 4 °C. Riedili sme ju ústojným bujónom (podobne ako v každom pokuse pri očkovaní materiálu z kultúr na vajíčka) a očkovali v určitých intervaloch na kuracie embryá. Výsledky z takto prevedených pokusov vidíme v tab. 2.

Tab. 2. Pokles infekčného titra suspenzie vírusu chrípky, kmeňa PR 8, v Geyovom roztoku uschovaného pri + 4 °C.

Pokus	Infekčný titer				
	0 hod.	½ hod.	1 hod.	2 hod.	4 hod.
1.	$10^{-4,0}$	$10^{-4,0}$	$10^{-4,16}$	$10^{-3,33}$	$10^{-2,66}$
2.	$10^{-4,0}$	$10^{-3,33}$	$10^{-3,33}$	$10^{-2,33}$	$10^{-2,36}$

Vírus udržovaný v Geyovom roztoku 4 hod. pri + 4 °C mal nižší infekčný titer o 1,33 log, resp. o 1,64 log ako v momente vkladania do chladničky. Môže sa tu jednať o účinok solí na vírus, ale podstatu zníženia infekčného titra nepoznáme.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Diskusia

Rozmnožovanie vírusu chrípky prebieha v cykloch. Jeden cyklus predstavuje tieto etapy: adsorbciu vírusu na vnímavé bunky, vstup do bunky, vnútrobunkové rozmnožovanie a uvoľnenie vírusových častíc do tekutého prostredia. V pokusoch na kuracích embryách sa zistilo, že vírus chrípky sa počas 1 hod. absorbuje na entodermálne bunky chorionalantoickej blany a konštantná perióda (kedy sa vírus ešte neuvoľňuje do alantoickej tekutiny) trvá 5—6 hod. u typu A a 8—10 hod. u typu B (Henle a spol. 1947 a 1949). Blumenthal a spol. (1950) zistili, že po naočkovaní veľmi zriedeného inokula do alantoického vaku prvé 4 hod. nemožno dokázať vírus v alantoickej tekutine, ale po tomto období nastáva uvoľnenie vírusu do alantoickej tekutiny a titre infekčnosti vzrastajú. V deembryovaných vajíčkach nastáva uvoľnenie vírusu už po 4 hod. alebo skorej (Finter a spol. 1954), teda skorej ako v kuracích embryách. Henle (1954) zistil v pokusoch na deembryovaných vajíčkach, že v prítomnosti RDE je väčšie množstvo voľného vírusu ako v pokusoch bez RDE. To sa vysvetľuje tým, že RDE ruší receptory voľných neobsadených buniek a takto ostane väčšie množstvo vírusu voľne v tekutine.

Po konštantnej perióde nastáva uvoľnenie vírusu do alantoickej tekutiny, ale nie nepretržite. Blumenthal a spol. (1950) zistili tri obdobia, kedy sa nezväčšuje množstvo vírusu. Prvé obdobie je medzi 8. a 10. hod., druhé medzi 14. a 16. hod. a tretie medzi 18. a 22. hod. Podľa Henleho (1953) trvá prvý cyklus rozmnožovania vírusu chrípky typu A 8 hod., druhý cyklus pravdepodobne 6 hod.

Odlišné výsledky sme zistili v pokusoch s rozmnožovaním vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách. Odlišné výsledky môžeme vysvetliť tým, že na rozmnožovaní vírusu chrípky v tkanivových kultúrach sa môžu zúčastniť bunky všetkých troch zarodočných listov chorionalantoickej blany, v ktorých sa nemusí odohrávať ten istý cyklus rozmnožovania (Henle 1953). Chorionový a alantoický povrch chorionalantoickej blany adsorbuje a vytvára rovnaké množstvo vírusu chrípky (Tamm a Tyrrell 1954). Prvé rozmnoženie vírusu sme zistili medzi 4. a 8. hod. alebo medzi 8. a 12. hod. inkubácie. Zistili sme, že aj adsorbcia je predĺžená, ako to vidieť z obr. 1. Toto môže byť zapríčinené vrstvou plazmy, ktorá bráni vniknutiu vírusu do bunky podobne, ako to zistil Klöne (1954) u vírusu poliomyelitídy. Veľké ťažkosti robí však dosť značné množstvo neadsorbovaného vírusu v tekutom prostredí po adsorbcii a vniknutí vírusových častíc do buniek, takže sa nedá zistiť presne čas uvoľňovania vírusu z buniek do tekutého prostredia. Značné množstvo vírusu ostáva aj po výmene tekutiny a prepláchnutí kultúr, čo sa vysvetľuje tým, že sa môže adsorbovať len na bunky a nevniká do buniek alebo môže byť zachytený aj na povrchu plazmy. Po pridaní čerstvej tekutiny sa vírus uvolní a ďalej sa môže adsorbovať na vnímavé bunky. Ackermann a spol. (1955) zistili, že vírus adsorbovaný na bunky možno prepieraním tkaniva čiastočne odstrániť a predpokladajú, že môže ísť o reverzibilnú väzbu vírusu.

V suspendovaných tkanivových kultúrach trvá adsorbcia vírusu na bunky 2 hod. (Womack a Kass 1953). V nasledujúcich 6—10 hod. nastáva relatívna stabilizácia a fluktuácia infekčných titrov následkom vnútrobunkového rozmnožovania vírusu. Potom nastáva rýchly vzostup infekčných titrov. Toto obdobie trvá 6 hod. Celý cyklus počas prvého obdobia rozmnožovania vírusu trvá 18 hod. Kým sa dosiahne maximálny infekčný titer, opakujú sa tri — štyri cykly.

V priebehu rozmnožovania vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme nezistili hranice medzi jednotlivými rozmnožovacími cyklami. Odlišné výsledky sme dostali, keď sme pestovali vírus chrípky, kmeň PR 8 v tkanivových kultúrach zo zmiešaných tkanív celého kuracieho embrya v prítomnosti zložitého prostredia. Až medzi 16—20 hod. alebo 20—24 hod. prevýši množstvo uvoľneného vírusu z buniek infekčný titer inokula nezávisle od výšky infekčného titra. Do tohto obdobia sa infekčné titre chovajú nepravidelne, niečo sa zvyšujú alebo znižujú. Takýto priebeh vzrastovej krivky vírusu možno vysvetliť účinkom inhibítorov rozmnožovania vírusu a menším počtom vnímavých buniek v tkanivových kultúrach zo zmiešaných tkanív z celého kuracieho embrya, alebo iným metabolizmom buniek ako v bunkách chorionalantoickej blany.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Priebeh vzrastovej krivky vírusu závisí aj od toho, či použijeme adaptovaný alebo neadaptovaný vírus. Wang (1948) zistil pomalé rozmnožovanie neadaptovaného vírusu na myšiach. U adaptovaného vírusu je maximálne rozmnoženie infekčnosti už po 12 hod., kým u neadaptovaného až po 48 hod. Adaptovaný vírus sa začne rozmnožovať na myšiach po 6 hod. a neadaptovaný vírus len po 12 hod. (Davenport a Francis 1951).

Rozmnožovanie vírusu chrípky, kmeňa A_1 Čs 1 - 1951, je menej pravidelné ako laboratórneho kmeňa PR 8. Je známe, že A_1 kmene sa aj ťažšie pestujú v tkanivových kultúrach. Henle a Rosenberg (1949) nepozorovali rozdiely v začiatku uvoľňovania vírusových častíc v kuracom zárodku u rôznych kmeňov skupiny A. Rozdiel je medzi typom A a B.

Po inokulácii vírusu chrípky A do alantoického vaku kuracieho embrya ostáva reziduálny hemaglutinačný titer konštantný 3—4 hod., načo sa začne zvyšovať. V prípade B vírusu je tento interval 4—5 hod. Keď vstrekneme silno zriedené inokulum, nestačí množstvo vírusu, uvoľneného z prvého cyklu rozmnožovania, spôsobiť hemaglutináciu a objaví sa neskoršie (Henlé 1953). Blumenthal a spol. (1950) dokázali prvé hemaglutiníny v alantoickej tekutine po 10 hod. inkubácie. V deembryovaných vajíčkach sa infekčný vírus a hemaglutiníny uvoľňujú súčasne po 4 alebo menej hodinovej inkubácii (Finter a spol. 1954). Womack a Kass (1953) pozorovali stúpnutie hemaglutinačných titrov v suspendovaných tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany po 12—16 hod. inkubácii a vrchol dosiahli až na 2. až 4. deň inkubácie.

V rozmnožovacích kultúrach z chorionalantoickej blany sme dokázali prvé hemaglutiníny najskorej po 20—24 hod. inkubácii. V rozmnožovacích kultúrach z celého embrya sme nemohli dokázať do 24 hod. hemaglutiníny; tie sa objavujú v tekutom prostredí kultúr až po tomto období. U kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 sme nedokázali v priebehu pokusov žiadne hemaglutiníny v tekutom prostredí, hoci infekčné titre sú značne vysoké. Príčinu tohto javu nevieme bližšie vysvetliť. Je možné, že spresnením hemaglutinačnej skúšky dali by sa dokázať hemaglutiníny aj v skorších obdobiach.

Súhrn

Sledovali sme dynamiku rozmnožovania vírusov chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách. Pokusy sme robili s vírusom chrípky A, kmeňom PR 8 a kmeňom A_1 Čs 1 - 1951. Tkanivové kultúry sme zakladali z chorionalantoickej blany a zmiešaných tkanív z celého kuracieho embrya.

Po adsorbcii a vnútrobunkovom rozmnožovaní vírusu pozorujeme prvé uvoľňovanie vírusových častíc do tekutého prostredia kultúr medzi 4. a 8. hod. inkubácie, niekedy aj o niečo neskoršie. Infekčné titre sa nepretržite zvyšujú a dosiahnu maxima už po 24 hod. alebo po 48 hod. inkubácie. Rozmnožovanie kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 je menej pravidelné ako rozmnožovanie laboratórneho kmeňa PR 8.

V prítomnosti kuracieho embryonálneho extraktu a konského séra vo výživnej tekutine kultúr zo zmiešaných tkanív z celého kuracieho embrya prevýši množstvo uvoľneného vírusu až po 16—20 hod. inkubácie množstvo pridaného vírusu ku kultúram.

Prvé hemaglutiníny v tekutom prostredí kultúr sme dokázali u kmeňa PR 8 najskorej po 20 hod., ale vo väčšine pokusov ešte neskoršie. Rozmnožovanie kmeňa A_1 Čs 1 - 1951 v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme pomocou hemaglutinačnej skúšky nedokázali.

Zistili sme, že množstvo vírusu v rozmnožovacích tkanivových kultúrach sa dá titrovať v titračných tkanivových kultúrach z chorionalantoickej blany, pestovaných v otáčavých skúmavkách, čo má význam pre laboratórnu prax, lebo sa tým ušetrí mnoho materiálu.

Za technickú spoluprácu ďakujem M. Kubalovej

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Literatúra

Ackermann, W. W., Ishida, N., Maassab, H. F.: *Growth characteristics of influenza virus concerning the binding of virus by host cells.* J. Exp. Med. 102 : 545, 1955.

Blaškovič, D. a spol.: *Laboratórne metódy vo virológii.* Bratislava 1954.

Blumenthal, H. T., Greiff, D., Pinkerton, H., De Witt, R.: *Influenza. I. The hemagglutination and infectivity titre curves of PR 8 influenza virus cultivated in embryonated eggs at different temperatures.* J. Exp. Med. 91 : 321, 1950.

Davenport, F. M., Francis, T., Jr.: *A comparison of the growth curves of adapted and unadapted lines of influenza virus.* J. Exp. Med. 93 : 129, 1951.

Finter, N. B., Liu, O. C., Lieberman, M., Henle, W.: *Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. VIII. An experimental analysis of various deembryonation technics.* J. Exp. Med. 100 : 33, 1954.

Henle, W., Henle, G., Rosenberg, E. B.: *The demonstration of one-step growth curves of influenza viruses through the blocking effect of irradiated virus on further infection.* J. Exp. Med. 86 : 423, 1947.

Henle, W., Rosenberg, E. B.: *One-step growth curves of various strains of influenza A and B viruses and their inhibition by inactivated virus of the homologous type.* J. Exp. Med. 89 : 279, 1949.

Henle, W.: *Multiplication of influenza virus in the entodermal cells of the allantois of the chick embryo.* V knihe Smith, K. M., Lauffer, M. A.: *Advances in virus research.* New York 1953 (str. 141).

Henle, W., Liu, O. C., Finter, N. B.: *Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system IX. The period of liberation of virus from infected cells.* J. Exp. Med. 100 : 53, 1954.

Horváth, S.: *A new sensitive method of the rolling drum type for influenza virus titration.* Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 1 : 481, 1954.

Klöne, W.: *Der Nachweis des Poliomyelitis Virus in Stuhlproben mittels der Gewebekultur.* Z. Hyg. Infektkr. 140 : 58, 1954.

Reed, L. J., Muench, H.: V knihe Blaškovič, D. a spol.: *Laboratórne metódy vo virológii.* Bratislava 1954.

Tamm, I., Tyrrell, D. A. J.: *Influenza virus multiplication in the chorionallantoic membrane in vitro: Kinetic aspects of inhibition by 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole.* J. Exp. Med. 100 : 541, 1954.

Wang, C. I.: *The relation of infectious and hemagglutination titers to the adaptation of influenza virus to mice.* J. Exp. Med. 88 : 515, 1948.

Womack, C. R., Kass, E. H.: *Influenza virus in allantoic sac tissue culture. Quantitative studies on nucleic acid content during growth and in the presence of cortisone.* J. Immunol. 71 : 152, 1953.

Динамика размножения вируса гриппа в тканевых культурах во вращающихся пробирках

Я. Санто и Н. Валентова

Резюме

Авторы исследовали динамику размножения вируса гриппа в тканевых культурах во вращающихся пробирках. Опыты производились с вирусом гриппа типа А, штамм PR 8 и штамм A_1 Čs. 1—1951. Основой тканевых культур служили хориоаллантоисные оболочки и смешанные ткани всего куриного зародыша. После адсорбции и внутриклеточного размножения вируса первые признаки выделения вирусных частиц в жидкую культивационную среду наблюдаются между 4-ым и 8-ым часом инкубации, а иногда и несколько позднее. Инфекционные титры непрерывно повышаются и достигают максимума через 24—48 час. инкубации. Размножение штамма A_1 Čs. 1—1951 отличается меньшей правильностью, чем размножение лабораторного штамма PR 8. В присутствии в питательной среде куриного эмбрионального экстракта и лошадиной сыворотки в культурах из смешанных тканей всего куриного зародыша количество выделяемого вируса превышает количество вируса, прибавленного к культуре, только через 16—20 часов инкубации. Наличие гемагглютининов в питательной среде культур штамма PR 8 мы впервые устанавливали после 20-часовой инкубации, а в большинстве случа в еще позднее. Размножение штамма A_1 Čs. 1—1951 в тканевых культурах во вращающихся пробирках не было нами с помощью реакции гемагглютинации доказано. Авторы установили, что титрация количества вируса в тканевых культурах, служащих для его размножения, возможна в культурах хориоаллантоисных оболочек во вращающихся пробирках, — что имеет значение для лабораторной практики ввиду значительной экономии материала.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

The Dynamics of Reproduction of the Influenza Virus in Tissue Cultures in Roller Tubes

J. Szántó and N. Valentová

Summary

The dynamics of reproduction of the influenza virus were observed by the authors in tissue cultures in roller tubes. The experiments were performed with the influenza virus type A, strain PR 8 and strain A_1 Čs 1 - 1951. Tissue cultures from the chorio-allantoic membrane and mixed tissues of the whole chicken embryo were used. Following adsorption and intracellular proliferation of the virus, the first liberation of virus particles into the liquid phase of the cultures may be observed after 4—8 hours of incubation, sometimes a little later. The infection titres continuously increase and reach a maximum after 24—48 hours of incubation. The proliferation of the strain A_1 Čs 1 - 1951 is less constant than the proliferation of the laboratory strain PR 8. In the presence of the chick embryo extract and horse serum in the nutritive fluid of cultures from mixed tissues of the whole chicken embryo, the amount of liberated virus surpasses the quantity of virus originally added to the cultures after 16—20 hours of incubation at the earliest. The first haemagglutinins were not found to be present in the liquid phase of the cultures until after 20 hours of incubation in the case of strain PR 8, while in most of the other experiments they appeared still later. We did not succeed in demonstrating the proliferation of the strain A_1 Čs 1 - 1951 in tissue cultures in roller tubes with the aid of the haemagglutination test. It was found that it is possible to titrate the amounts of the virus in these proliferating tissue cultures in titration tissue cultures from chorio-allantoic membrane kept in roller tubes. This finding is important for practical laboratory work, since in this way it is possible to save a large amount of material.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií*)

Přes tyto obtíže každý, kdo se pozorováním množení bakterií někdy zabýval, si musil všimnout, že vzniklé buňky nejsou rovnocenné. Některé z nich ustávají v dělení dříve, jiné později, některé z nich odumírají. Jejich různocennost lze sledovat podle vzhledu buď v barveném preparátu nebo ve fázovém kontrastu. To lze celkem dobře pozorovat u kvasinek nebo streptokokků, kde jsou v řetízku za použití Erhlichova barvení některé buňky modré a jiné červené. Již z toho jednoduchého důkazu je možno usoudit, že hlásaná nesmrtelnost bakterií neexistuje a že mikroorganismy mají v individuálním vývoji jako všechno na světě svůj vznik, růst a zánik. Tento individuální vývoj není podmíněn jenom vnitřními faktory, ale i vnějšími podmínkami. A tak každá mikrobní kultura je společenství, v němž se vyskytují jedinci různého stáří: nalézáme tu jedince mladé, jedince v období intensivního množení, jedince hynoucí a mrtvé. A protože v průběhu individuálního vývoje každého organismu — a tím více je tomu u bakterií — se mění poměry ve výměně látkové, v reaktivnosti na prostředí, atd., pak jakákoli kultura mikroorganismů se skládá z jedinců značně morfologicky i fysiologicky rozlišených. Tato diference se stupňuje vlivem nestejnoměrnosti vnějších podmínek. Kultura se mění, a to tím více, čím více se mění vnější podmínky ve statických podmínkách a zvláště pak na pevných půdách i činností vlastních bakterií. Na takových pevných substrátech u čistých kultur při delším uchovávání vznikají formy morfologicky i fysiologicky odlišné od původního kmene. Staré kultury *E. coli* na pevných půdách při pokojové teplotě tvoří mukosní valy. V kolonii se zvětšuje počet G-variabilních nebo G-positivních buněk. Buňky se mění i tvarem. U některých dochází k zvýšení granulace plasmy, později i k rozpadu. U kultury *Str. lactis*, která byla delší dobu pěstována na MPA, mizely typické řetízky, kultura vytvářela žluté barvivo a mikroskopicky bylo možno pozorovat tetrády. Enzymatická činnost se značně snížila. Vznikly nové formy mikroorganismů s vlastnostmi odlišnými od původního kmene. Mikrobní kultury prošly tak určitým vývojem, ovlivněným vnějšími podmínkami. Očkováním jsme dosáhli upevnění těchto znaků v určitém směru, i když ne zaměřeném k přesnému cíli. Abychom dosáhli takového třeba nechtěného výběru, musí tu být proměnlivost mikrobů a musí tu být i přežívání forem, které jsou nejvíce přizpůsobené daným vnějším podmínkám.

Kdyby však všechny dceřinné buňky byly rovnocenné, nemohla by tu být proměnlivost a nemohl by tu být ani vývoj. Ale jak akademik Málek ukazuje, v mikrobních kulturách není této rovnocennosti. Je třeba si proto všimnout citace Ijerusalimského: „Příčinou jejich individuální rozličnosti jsou rozličné podmínky, za jakých se jednotlivým mikrobům dostává potrava." Ijerusalimskij uvádí dále, že jsou tři druhy buněk, z nichž některé dají několik vegetativních dělení a vytvářejí spory, jiné nedokončí svůj životní cyklus a třetí „se tak silně opozdí ve vývoji, že hynou, jakmile se setkají se silně měnivšími se podmínkami ve staré kultuře. Z toho je vidět, že v mikrobních kulturách probíhá *přirozený odpad jedinců*" (podtrženo mnou J. V.). Domnívám se, že toto je nejlepším dokladem, že v mikrobních kulturách je přežívání a tudíž vnitrodruhový boj jako konec konců v celé přírodě, do níž podstatně nezasáhl člověk. Veškerý faktický materiál, který je snesen v práci akademika Málka na toto tema, jasně ukazuje, že toto soutěžení skutečně existuje. Při tom se nesmíme dívat na „vnitrodruhový boj" jako na pouhé požírání, nýbrž jako na přežívání nejschopnějších jedinců. Tak o něm také hovoří Engels v Dialektice přírody, kde píše: „Proto boj o život je jen název, a to ještě ne přesný, pro něco co existuje, ale co má různé formy, to je mnohem složitější, než aby se dalo uzavřít do jednoduché formulace býti požírán".

Přesto, že akademik Málek snesl mnoho materiálu ve dvou kapitolách, které podporují takovýto pohled na vzájemnou konkurenci uvnitř druhů, přece souhlasí s Krasiľnikovem v tom, že boj uvnitř druhů neexistuje.

Krasiľnikov říká: „Kdyby byla teorie vnitrodruhového boje správná, byl by nejostřejší boj mezi buňkami v období logaritmického růstu, kdy probíhá rozvoj a množení nejbouřlivěji a je tudíž i největší potřeba všech životních zásob". (Málek str. 74). Domnívám se, že se tady Krasiľnikov mýlil. Bojovat v době logaritmického růstu, to znamená tehdy, kdy je všech živin dost, to by byl boj pro boj, a s takovým metafysickým vysvětlením souhlasit nemůžeme. Jistě že nebudeme bakterie obviňovat, že při nadměrné výživě bojují o nějaké náboženské smýšlení. V živé přírodě se může vyskytovat vzájemné soutěžení teprve tehdy a také se vyskytuje, kdy je živin nedostatek. Právě tak vzájemná pomoc se může vyskytovat a také se vyskytuje tehdy, kdy je živin nadbytek.

Na téže stránce Málek píše: „A i hynutí buněk, které se pozoruje v období stacionerním a v období úbytku, nemůže být výsledkem vzájemné konkurence nebo boje o výživu a jiné prostředky k životu, nýbrž dovozuje, že jde o přežívání jedinců ovlivněných jejich individuálními zvláštnostmi. Při tom dále rozbírá, v čem jsou tyto individuální zvláštnosti, ale zdůrazňuje, že různorodost mikrobů v kultuře,

*) Dokončení článku uveřejněného ve 4. čísle Čs. mikrobiologie.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

která se projevuje právě různou životaschopností, je běžným zákonitým dějem v každé kultuře. Myslím, že jeho důkazy jsou dostatečné, abychom teorii vnitrodruhového boje při růstových křivkách naprosto a důrazně mohli odmítnout". Tak na jedné straně se uznává přežívání nejschopnějších jedinců zcela v darwinovském slova smyslu, uznává se, že metabolismus a celková činnost mikrobů je u jedněch jedinců lépe vyvinuta než u druhých, na druhé straně se ukazuje, „že odumírání mikrobů v kultuře je ovlivňováno zevními vlivy a tedy i prostředím, které si mikroby ve statických poměrech vytvářejí" a přece toto hynutí nemá být výsledkem vzájemné konkurence?

Domnívám se, že chyba tkví v tom, že jsme příliš nekriticky převzali některé názory Lysenkovy, který popírá jakoukoliv soutěž nebo vzájemnou pomoc uvnitř druhu, protože si nejdříve pojem boje o bytí zúžil na ono vzájemné požírání, s kterým se samozřejmě na pšeničném nebo žitném poli nemohl shledat.

Je přece známo, že různorodost každého zrna a tím i každého stébla je mnohem menší. Základní snahou šlechtitelů a pěstitelů je to, aby osivo bylo stejnoměrné. Také jedinci na každém poli jsou stejně staří. Jinak je tomu ovšem v mikrobních kulturách, jinak je tomu i v celé ostatní přírodě, pokud do ní nezasáhl lidský zákrok do takové míry, jako při pěstování polních plodin. Uznáváme-li existenci vzájemné pomoci a vzájemného soutěžení u mikroorganismů, neznamená to, že se chceme zastávat Bailova zákona o tak zvané M-koncentraci nebo dokonce malthusiánství. Bail z nedostatečně prověřeného pokusného materiálu došel k závěrům, že v určitém objemu živné půdy může být dosaženo jen určité koncentrace a že za maximální koncentrace sice nepřestává množení bakterií, ale část buněk musí odumírat, aby byla tato ideální koncentrace zachována. Bail při tom podceňuje význam vnějších podmínek prostředí, množení bakterií je u něho ovládáno jakýmisi vyššími silami. Proto je tato teorie špatná a nepravdivá. Pokud se týče Malthusovy teorie byla již tolikrát vyvrácena, že se domnívám, že není vůbec zapotřebí se zabývat jejími pavědeckými vývody.

Není tedy otázkou, zda vzájemná konkurence ve společenství mikroorganismů stejného druhu existuje, ale musíme se ptát, k čemu vede a zda je účinným faktorem při selekci mikroorganismů. Rychlé vymírání ve stacionární fázi je zaviněno tím, že se přestávají množit jen některé buňky, to je buňky méně schopné. Nesporně působí tady také proteolytické fermenty bakterií. Vždy se však ve starých kulturách s vyčerpanými živinami a nahromaděnými produkty metabolismu vyskytují buňky, které se množí, a to je vlastní podstata darwinovského přirozeného výběru, čili přežívání nejschopnějších. Může však být tento výběr z neúměrného množení ku prospěchu při hledání nových a výkonných ras mikroorganismů? Můžeme se domnívat že nikoli, protože neprobíhá v přesně řízeném směru. Proto metoda starých kultur není pokládána za výhodnou pro selekci nových průmyslových odrůd.

To ovšem neznamená, že bychom neměli nebo že nepoužíváme v průmyslu výrobních procesů, při nichž necháváme projít kulturu všemi obdobími až do částečného úpadku. To platí zejména tam, kde nám jde o produkt mikrobní výměny látkové a nikoli o samotnou mikrobní hmotu (na př. výroba vína, kvašení piva, atd.).

Při umělé selekci mají daleko větší význam ty metody, při nichž přizpůsobujeme mikroorganismy změněným podmínkám tak, aby přežívající jedinci byli lépe těmto podmínkám přizpůsobeni. Jedním z takových způsobů může být metoda selekce v proudícím prostředí. Můžeme ji tedy zvláště při postupné změně vnějších podmínek, na př. postupném zvyšování koncentrace živin, pokládat za metodu aktivní selekce pro průmyslové organismy.

Ještě k otázkám ontogenese mikrobů a k názorům na stadijní vývoj u mikroorganismů. Domnívám se, že je nutno souhlasit s názorem akademika Málka, že je „zásadně nesprávné vysvětlit změny v kultuře jako směny jednotlivých stadií". Někteří autoři často mechanicky přenášejí významné Lysenkovy objevy o stadijnosti u rostlin na mikroorganismy. Směšují individuální vývoj mikroorganismů s vývojem stadijním, což není správné.

Aby některá rostlina prošla celým individuálním vývojem a dostala se do údobí zralosti, musí projít určitými stadii, na př. tepelným a světelným. Neprojde-li těmito stadii, nevytváří květy ani plody. A jak je tomu u mikroorganismů? Je možno pokládat sporulaci za období zralosti? Vždyť spora není reprodukčním orgánem a k sporulaci dochází na základě reakce mikrobní buňky na vnější podmínky. A ani vegetativní buňky ani spory nemohou být nějakými stadii, nýbrž jsou součástí individuálního vývoje mikrobní buňky. Dále, stadijnost u rostlin mohla vzniknout na určitém stupni fylogenetického vývoje. Hledat obdobu této stadijnosti u mikroorganismů, které jsou na mnohem nižším stupni fylogenetického vývoje, by nebylo správné. I kdybychom to však chtěli, museli bychom si nejdříve uvědomit, kdy individuální vývoj u mikroorganismů začíná a kdy končí. Jak je tato otázka těžká, dokazuje citát z Engelsovy Dialektiky přírody (str. 181): „U nižších živočichů nelze přesně stanovit, co je individuum. Nejen to, zda je živočich individuum nebo kolonie, nýbrž také kde ve vývoji jedno individuum přestává a druhé začíná". Tím spíše tomu je u mikroorganismů.

Abychom mohli otázky vývoje mikrobní buňky zhodnotit, museli bychom především znát zákonitosti tohoto vývoje kromě jiného také ve vztahu k ultraformám nebo nebuněčným formám mikroorganismů.

Zabýval jsem se snad poněkud déle teoretickými úvahami, domnívám se však, že si této pozornosti zasluhují. Víme však všichni z vlastní zkušenosti, že u nás je nechuť diskutovat o těchto otázkách, které nebyly oficiálně přijaty nebo zavrženy. Naproti tomu jakmile je jednou nějaká teorie oficiálně

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

uznávána, je všeobecně a s úžasnou rychlostí asimilována. Tak je možno pozorovat u některých našich odborníků větší přizpůsobivost než u mikroorganismů. Někteří pracovníci se snad někdy bojí otevřeněji promlouvat k některým teoriím. Přijímají je nekriticky a uznávají je automaticky. Víme dobře, jak probíhaly diskuse právě v oboru biologie. Snad je důvod ten, že někteří vědečtí pracovníci se bojí otevřeně přiznat své názory, aby snad na to nedoplatili na základě tak popíraného boje o existenci svou vlastní existencí.

Vraťme se však k otázkám použití průtokových metod. Řekli jsme si, že i když máme dosud málo zkušeností s použitím těchto metod pro řízenou proměnlivost mikrobů nebo pro selekci průmyslových mikroorganismů, dávají tyto metody určitý příslib do budoucna. Jde o to, aby byly používány nejenom na pracovišti, kde byly vynalezeny a prohloubeny, ale také na nejčetnějších jiných ústavech, kde se pracuje v teoretické i užité mikrobiologii. Jistě, že by potřebovala pro určité aplikace určitých změn. Nadhodili jsme tu možnost kombinace pevného substrátu jako nosiče s průtokovou metodou a domníváme se, že právě v zemědělské mikrobiologii by bylo užití pro získávání nových účinnějších kmenů, a to zvláště u azotobaktera. Zde bych se chtěl zmínit o jedné důležité věci, na niž narazil akademik Málek a která má i praktický význam. Málek uvádí, že při pěstování azotobaktera při silném větrání se vytvářely převážně buňky protáhlé, při větrání menším a tedy i při menším pohybu tekutiny buňky kulaté, přecházející ke klidovým formám. S podobnými nálezy jsme se setkali i my při kultivaci azotobaktera ve velkém objemu živné půdy za silného provzdušňování. Při tom je zajímavé, že větší fixace dusíku byla v buňkách mladých, protáhlých a rychle se dělících. Když však tyto formy azotobaktera byly přeneseny na Ashbyho agar, nevytvářely se kolonie typické, pigmentované, nýbrž drobné kapkovité kolonie. Teprve po delší době se azotobakter přizpůsobil novému prostředí, kolonie se začaly přeměňovat a zvolna pigmentovat. Je tedy zřejmé, že na změněné podmínky v pohybovém (i když ne průtokovém), silně větraném prostředí reaguje azotobakter tak, že vytváří protáhlé, rychle se dělící tyčinky, které se jen zvolna přizpůsobují změně na agarovém substrátu. V půdě však jej nacházíme nejvíce ve formě klidové, kokkovité a silně pigmentující. Zamyslíme-li se nad touto skutečností, pak můžeme dojít k závěru, který se netýká jen kultivace azotobaktera v laboratoři, ale i jeho vlastností v půdě, že totiž by bylo možno vnějšími zásahy zvýšit účelně fixační schopnost azotobaktera i jeho množení. Určité pokusy jsou nyní prováděny v našem ústavu.

Přejdeme nyní k vlastnímu využití průtokové metody v průmyslu. Zdá se, že tam, kde jde o získání co největší masy mikrobů, je průtoková kultivace se stálým přítokem živin jistě vhodnější než metody statického množení. To, že můžeme stálým přívodem živin několikráte zvýšit koncentraci mikroorganismů, které při tom nepřecházejí do údobí stacionárního, ale zůstávají dlouhou dobu v údobí logaritmického množení, má velký význam pro průmyslovou výrobu krmného droždí a pod. Právě tak bude lze využít průmyslově průtokové metody pro získávání plísňových amylas, penicilinu, kyseliny citronové, atd. Všude tam, kde jde o oxydativní procesy, může se aplikovat s úspěchem průtoková metoda (na př. výroba octa). Jak je tomu u klasického kvasného průmyslu? I v tomto průmyslu se přechází stále více a více na kvasné kontinuální metody. Nicméně se snahy nahradit periodičnost výrobních procesů v kvasném průmyslu zaváděním kontinuálních metod nestaly všeobecnými. A není tím vinen jen konservatismus tohoto průmyslu se starou tradicí, že nedošlo k zásadní změně technologického procesu. Jsou tu i jiné překážky. Jen namátkou uvádím, že v zemědělském lihovarství je to jednak rozsah závodů, jednak jiné faktory, jako hustota používaných zápar, vžitý způsob sladování, atd. Tam bude asi velmi těžko přejít na kontinuální metodu. Je též otázkou, do jaké míry by to bylo ekonomické. V pivovarství nám nejde ani o produkci biomasy, ani o množství produktů látkové výměny, ale o jakost konečného výrobku. Připusťme, že by se nám mohlo podařit zkvašovat kontinuálně mladinu v první fázi a nahradit tak kvašení ve spilce. Rozhodně však není možno nahradit kontinuálním způsobem kvašení v ležáckých sudech, kde nám jde o to, aby se kromě jiného pivo nasytilo kysličníkem uhličitým a dostalo svůj typický charakter. Podobně je tomu i u vína. Vždyť v těchto kvasných procesech nám jde o to, aby proběhly všechny čtyři fáze, jak je známe ze stacionárního způsobu kultivace, aby kvasinky splnily svůj úkol, ssedly a výrobek se vyčistil. U acetonbutanolového kvašení by byla obtížná konstrukce průtokových tanků, v nichž by se udrželo anaerobní prostředí. Velké možnosti, jak uvádí Málek, má průtoková metoda při výrobě antibiotik a bakterií. V menších průmyslových odvětvích nebo tam, kde se mikrobní činnosti používá jen v omezené míře, bude se třeba nad zaváděním průtokových metod ještě zamyslit. Snad by přicházelo v úvahu mlékařství, ačkoliv při zrání smetany jde o poměrně malé množství materiálu. Jistě však by to stálo za zkoušku.

Celá mlékařská výroba je kontinuální. Jen zrání smetany a stloukání másla je periodické. V poslední době se však zavádí kontinuální výroba másla ze sladké smetany. Víme však, že toto máslo, které neobsahuje ani kyselinu mléčnou, vzniklou bakterijní činností, ani přirozeně vzniklý diacetyl, není trvanlivé ani chutné. Kdyby se nám vhodným způsobem podařilo zařadit zrání smetany kontinuálně, byla by periodičnost podstatně odstraněna. Je to ovšem obtížné pro poměrně dlouhou dobu zrání smetany, pro další technické obtíže i proto, že nám jde o získání určitých chuťových vlastností hotového výrobku. Je však škoda, že naši mlékařští odborníci se otázkami průtokové kultivace dosud nezabývali. Právě v mlékařství totiž vidíme, že množení v proudícím prostředí má pro tento průmysl velký význam, i když v negativním směru. Setkáváme se s tím na každém kroku, v každé mlékárně při reinfekci mléka. Tento zjev byl dlouho vykládán staticky. Snažili jsme se již dříve ukázat, že mlékárenská výroba

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

je střídání výrob průtokových se statickými a reinfekci mléka nebylo lze i při nejlepší kontrole vyložit na základě stávajících zásad. Stačí na př. malé znečištění potrubí, malý zdroj infekce a pouhá skutečnost, že je tu stálý přítok živin, znamená, že se mikroby v dalším výrobním procesu neúměrně intensivně množí a výrobek infikují. Tak malý zdroj infekce v potrubí, na chladiči nebo v pumpě může mít za následek znehodnocení celého produktu. Dřívější statické pojetí reinfekce vycházelo totiž z toho, že za místo reinfekce se v provozu označoval ten úsek, který vykazoval nejvyšší vzrůst v počtu kolonií na deskách. Tak na př. mléko vytékající z pasteru vykazovalo hodnotu 100, po zchlazení 1000, v nádrži 10 000 a v konvi 50 000. Tu se předpokládá, že reinfekce nastala v nádrži nebo mezi chladičem a nádrží. To však, jak nám někdy potvrdí rozbory otiskovou nebo nátěrovou metodou, nemusí být správné, protože se neuvažuje přirozené pomnožování bakterií v proudícím prostředí. Nakonec je objeven zdroj infekce. A malý zdroj, díky velké pomnožovací schopnosti, může podstatně ovlivnit celý výrobní postup. Podobně jsme zjistili nebezpečné zdroje infekce u plnicích strojů na lahvové mléko. Pravidelné stékání mléka přes ohnisko infekce znamená značné pomnožení mikrobů. Tyto zjevy se však netýkají jenom bakteriologie mlékařské. Můžeme se s nimi setkat v řadě potravinářských provozů na př. při výrobě limonád, při stáčení piva, v konservárenství, atd. I zde vidíme použitelnost metody Málkovy pro řešení konkretních úkolů v potravinářské výrobě.

Z toho, co jsem zde uvedl, myslím vyplývá, že můžeme hodnotit práci akademika Málka kladně. Je to především proto, že autor se v ní snaží vyrovnat se s některými základními teoretickými otázkami a postavit hypotesy nové, jako na př. hypotesu dělení bakterijních buněk a množení ve statických kulturách. Za druhé je to proto, že autor dochází k závěrům o výhodnosti množení mikrobů v průtokovém prostředí, což má význam nejen pro práce teoretické, nýbrž pro širokou výrobní praxi. Když akademik Málek psal tuto knihu, jistě nezamýšlel napsat vyčerpávající monografii o tak složitém problému, jako je množení mikroorganismů. K tomu by bylo zapotřebí ještě mnohého ověření výsledků cizích prací, bylo by zapotřebí mnohé trpělivé práce a práce celých kolektivů. Autor chtěl především ze své bohaté praxe i na základě teoretických úvah dát impuls k rozvinutí nejen odborné diskuse, ale i vědecké práce navazující na jeho základní pojetí dělení a množení bakterií. Proto musíme knihu akademika Málka hodnotit jako přínos mikrobiologické vědě, který přesahuje svým významem hranice našeho státu.

U nás byla za poslední desetiletí publikována řada knih z mikrobiologického odvětví, avšak nenajdeme mezi nimi jediné, která by se tak zásadně, jak to činí kniha Málkova, vypořádala s problematikou tohoto odvětví. Proto se domnívám, že Málkova práce O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií je celým svým pojetím významným dílem. Jsem přesvědčen, že kniha by mohla vzbudit ohlas daleko za hranicemi naší vlasti a nesporně větší ohlas, než jaký způsobily kterékoli předchozí Málkovy práce u nás. Musíme se opravdu divit, že mimo Biologický ústav není dosud pracoviště, kde by se důsledně a systematicky konaly pokusy s metodou proudícího prostředí, jak by si to tato metoda zasluhovala. Je také chybou, že náš vyspělý sklářský a laboratorní průmysl ještě nevyrábí seriové zařízení pro průtokovou kultivaci. Domnívám se, že je to zaviněno tím, že naši výzkumní pracovníci nevyužívají dosud plně možností, které jim tato metoda dává k řešení teoretických i praktických problémů.

Proto navrhuji, aby se tato komise usnesla doporučit výzkumným pracovištím v oboru teoretické i aplikované mikrobiologie:

1. rozvinout vědecké bádání ve využití průtokové metody se zřetelem na řízení proměnlivosti mikroorganismů a na zvyšování výtěžků biomasy, fermentů i produktů metabolismu,
2. propracovat v jednotlivých odděleních mikrobiologie perspektivní plány v teoretickém bádání i aplikaci této metody a zajistit jejich řešení v průběhu druhého pětiletého plánu,
3. k tomu účelu zajistit výrobu příslušných průtokových laboratorních zařízení u našeho průmyslu,
4. tam, kde výsledky s průtokovou metodou překročily rámec laboratorní práce, urychleně zajistit pokusnou čtvrt nebo poloprovozní výrobu,
5. doporučit presidiu ČSAV, aby učinilo vše potřebné pro vydání Málkovy knihy s určitými změnami a doplňky v některém ze světových jazyků.

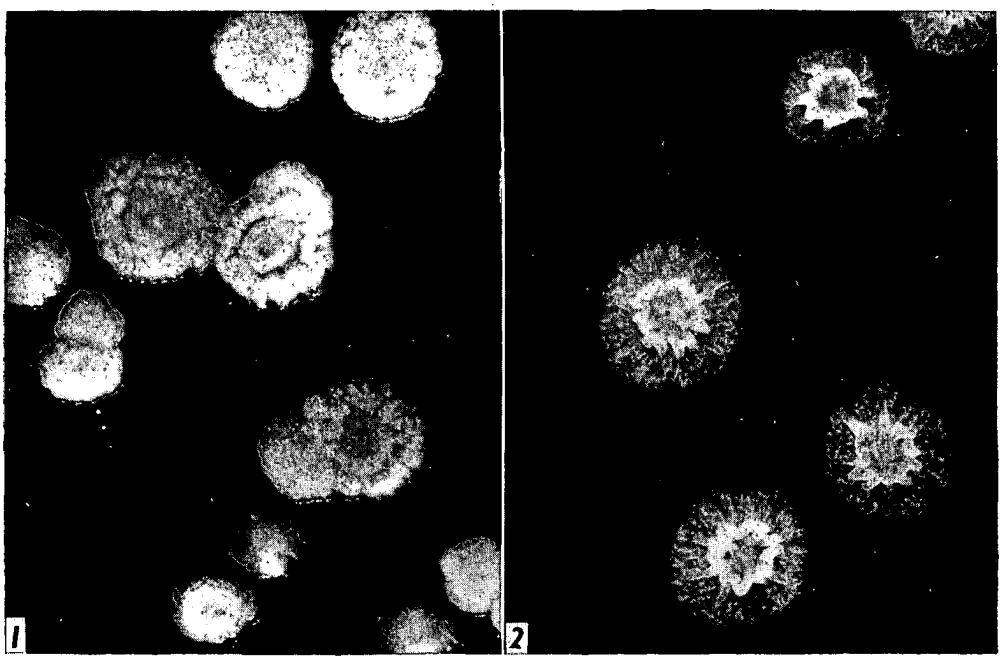
Končím svůj diskusní příspěvek a žádám všechny přítomné, aby nejenom v soudružské diskusi se vyjádřili k problémům, o kterých zde bylo mluveno, ale zejména, aby každý ve svém oboru se snažil ověřit, uplatňovat a rozvinovat nové zásady v kultivaci mikroorganismů a přispěl tak k dalšímu rozvoji mikrobiologické vědy u nás.

Doc. Dr Jaroslav Vintika

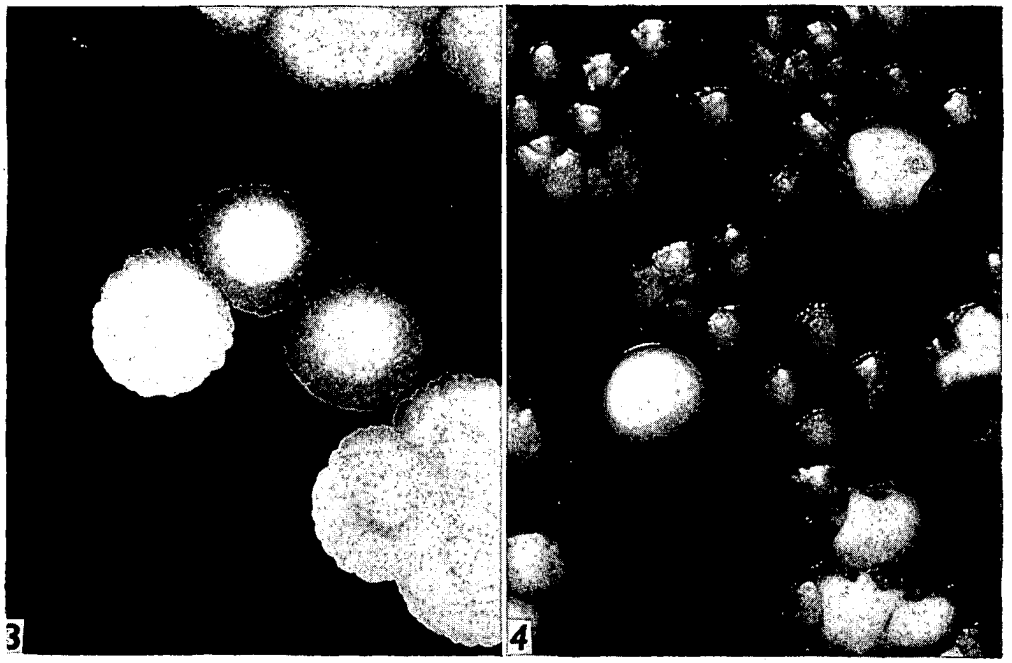
Vydává Biologický ústav Československé akademie věd v Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II. Adresa redakce: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Administrace: Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II, tel. 246241. Účet Státní banky československé č 438-214-0087, 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. října 1956. - A-13839

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

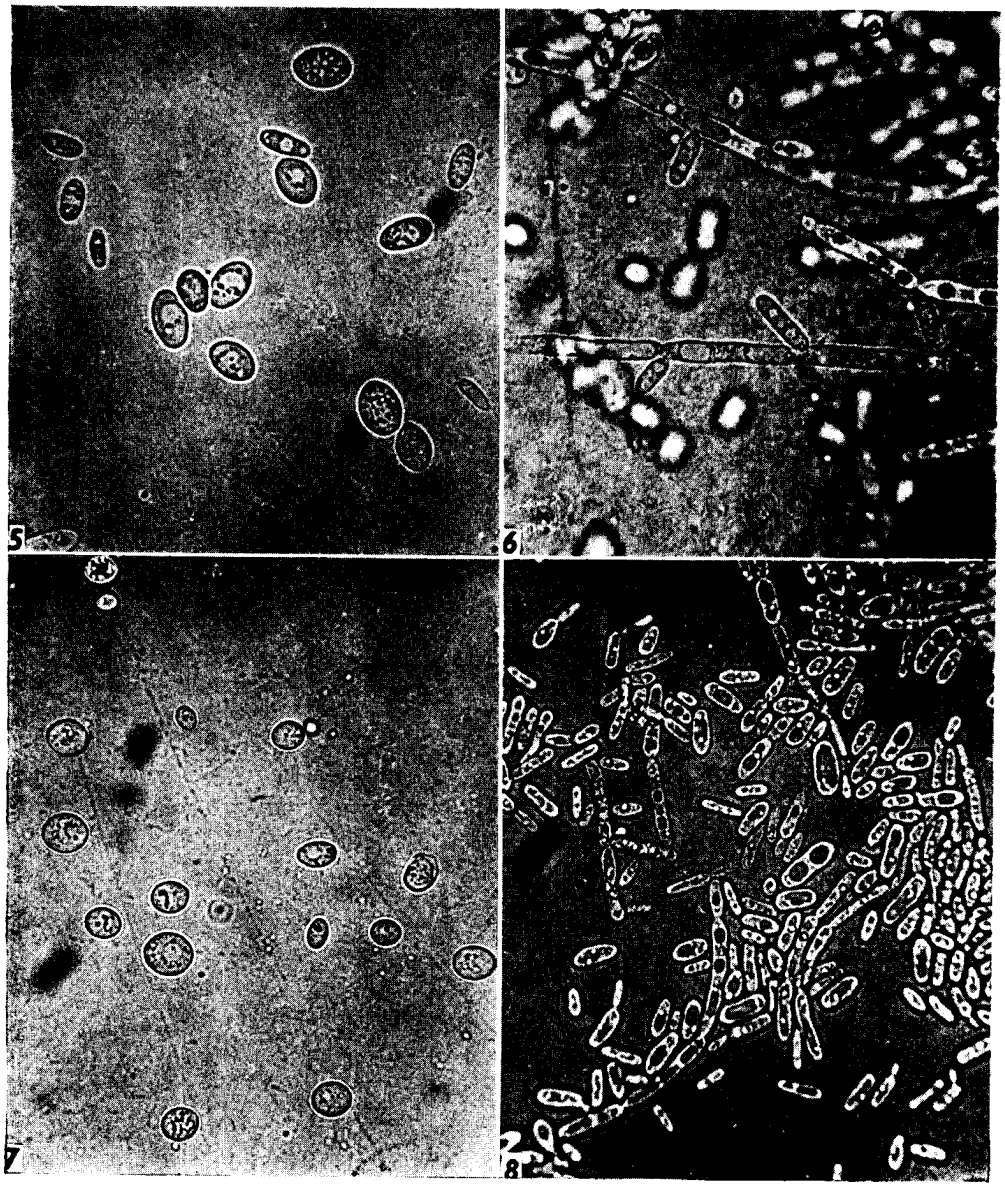


Charakter kolonií drsných forem na sladinkovém agaru. (Inkubováno 3 dny při 30 °C.) Foto N. Bezděk. Obr. 1. Dissociovaná kultura Sherry. Obr. 2. Vyisolovaná drsná forma *S. fragilis*. Obr. 3. Vyisolovaná drsná forma lihovarské kvasinky. Obr. 4. Dissociovaná kultura lihovarské kvasinky na sladinkovém agaru s 0,004 M cholátem sodným.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

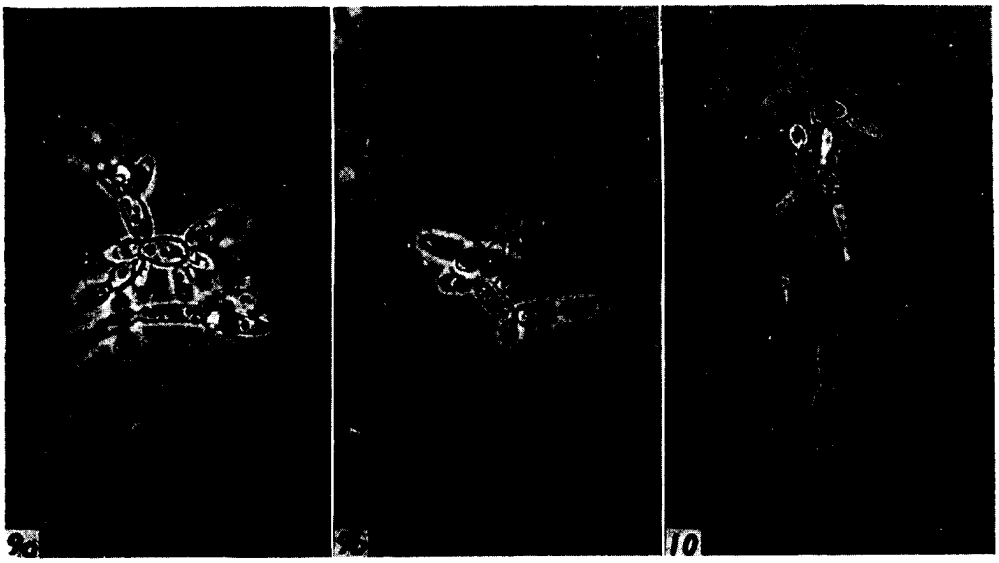


Charakter buněk hladkých a drsných forem ze sladinkového agaru. (Inkubováno 48 hod. při 30 °C.) Zvětšeno 800krát. Foto Ing. J. Vavák.

Obr. 5. *S. fragilis*, hladká forma. Obr. 6. *S. fragilis*, drsná forma. Obr. 7. Lihovarská kvasinka, hladká forma. Obr. 8. Lihovarská kvasinka, drsná forma.

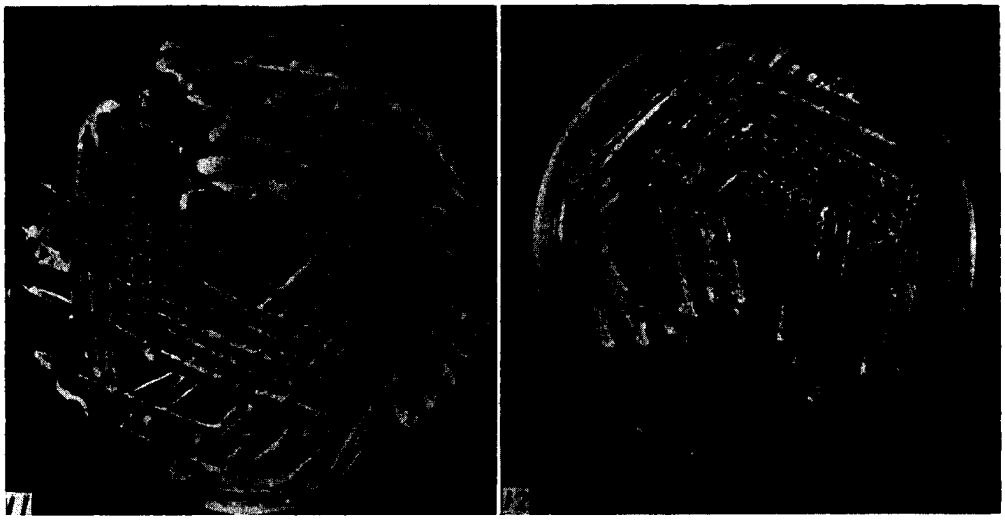
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0



Vliv cholátu sodného (0,12 M) na drsné formy kvasinek na sladince. Zvětšeno 800krát. Foto Ing. J. Vavák.

Obr. 9. *S. fragilis.* Obr. 10. Lihovarská kvasinka.

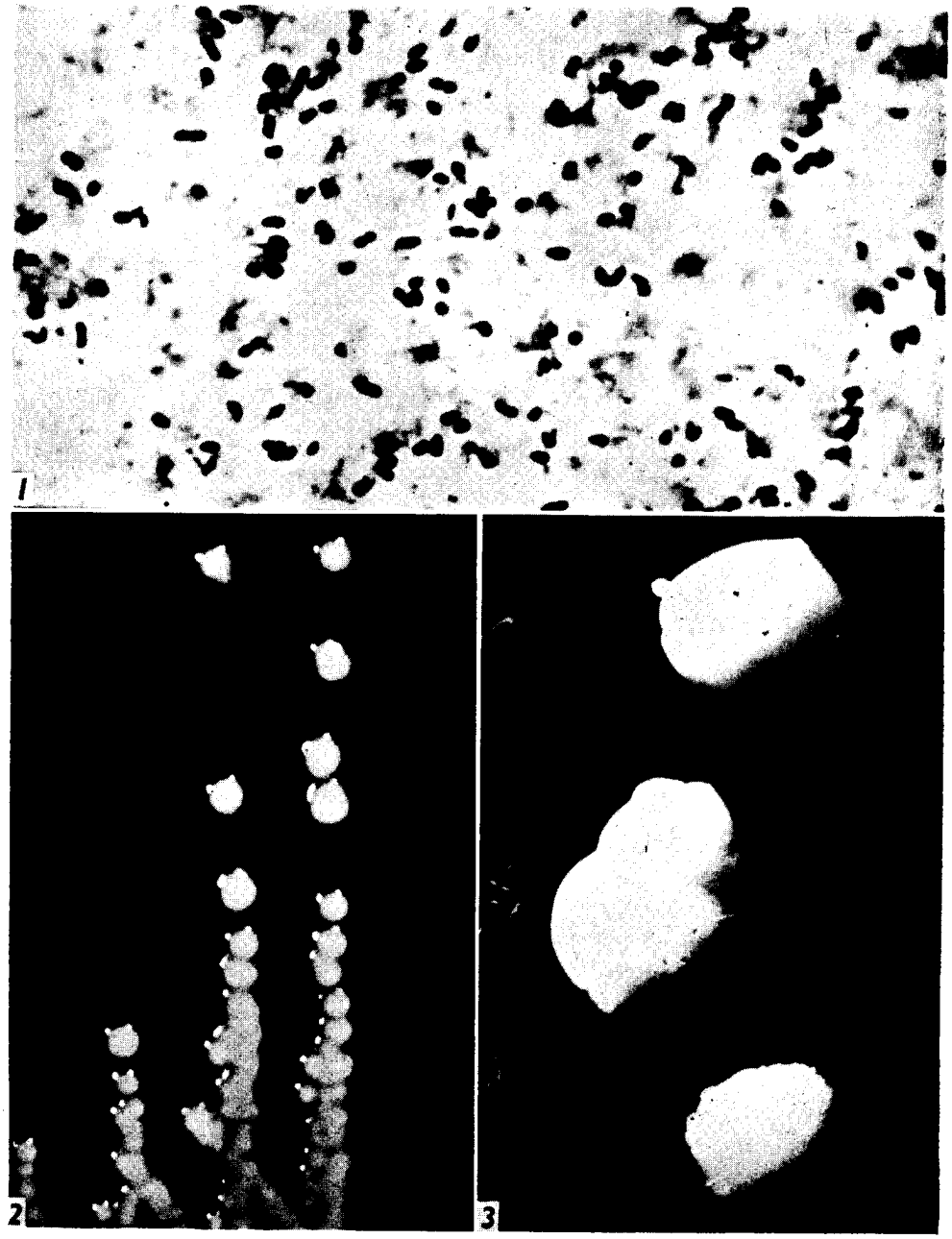


Vliv cholátu sodného na křísotvorné kvasinky 3 dny staré kultury. Foto N. Bezděk.

Obr. 11. *Pichia membranaefaciens,* na sladinkovém agaru. Obr. 12. *Pichia membranaefaciens,* na sladinkovém agaru s 0,12 M cholátem sodným (lesk kolonií je dobře patrný).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0



Obr. 1. *Pseudomonas noctuarum* v lymfě uhynulé housenky bource morušového. Barveno karbolfuchsinem. Zvětšeno 2000 ×. Foto Fiala.

Obr. 2. Kolonie *Pseudomonas noctuarum* na masopeptonovém agaru při 25 °C po 24 hod. Zvět. 4 ×.

Obr. 3. Kolonie *Pseudomonas noctuarum* na masopeptonovém agaru při 25 °C po 7 dnech. Zvět. 4 ×.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0

Přehled časopisů vydávaných Československou akademií zemědělských věd v letošním roce

Sborník ČSAZV — Veterinární medicina
(vychází 12krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 120 Kčs)

Sborník ČSAZV — Historie a musejnictví
(vychází 4krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 40 Kčs)

Sborník ČSAZV — Mechanisace a elektrifikace zemědělství
(vychází 5krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 60 Kčs)

Sborník ČSAZV — Zemědělská ekonomika
(vychází 6krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 60 Kčs)

Sborník ČSAZV — Rostlinná výroba
(vychází 12krát ročně, rozsah 112 stran, předplatné 168 Kčs)

Sborník ČSAZV — Živočišná výroba
(vychází 12krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 120 Kčs)

Sborník ČSAZV — Lesnictví
(vychází 12krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 120 Kčs)

Věstník ČSAZV
(vychází 12krát ročně, rozsah 56 stran, předplatné 96 Kčs)

Za socialistické zemědělství
(vychází 24krát ročně, rozsah 64 stran, předplatné 60 Kčs)

Sovětské zemědělství
(vychází 6krát ročně, rozsah 160 stran, předplatné 30 Kčs)

Sovětské lesnictví
(vychází 6krát ročně, rozsah 80 stran, předplatné 24 Kčs)

Přehled zahraniční zemědělské a lesnické literatury
(vychází 12krát ročně, rozsah 96 stran, předplatné 180 Kčs)

Přehled československé zemědělské a lesnické literatury
(vychází 12krát ročně, rozsah 32 stran, předplatné 60 Kčs)

Nové knihy zemědělských knihoven
(vychází 12krát ročně, rozsah 16 stran, s pravidelnou přílohou „Prameny literatury" předplatné 36 Kčs)

Československá akademie zemědělských věd administrace časopisů, Praha XII, Slezská 7

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500005-0