Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

# ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
1

ČÍSLO
6

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, PROSINEC 1956 - STR. 241—288

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

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

Chaloupka J.: Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus. III. Krátkodobá produkce enzymu . . . . . 241

Kocková-Kratochvílová A., Gebauerová A. a Hrdinová M.: Štúdium Harden-Youngovho efektu u kvasiniek. I. Voľba vhodných podmienok . . . . . 247

Matelová V. a Nečásek J.: Význam fermentačních podmínek pro produkci penicilinu kmenem Penicillium chrysogenum 51—20 . . . . . 255

Ševčík V., Podojil M., Kyselová M. a Vrtišková A.: Nové antibiotikum BU 306 . . . . . 263

Úlehla J., Spurný M. a Dostálek M.: Použití tečkovací reakce na sirovodík při sledování síranové redukce . . . . . 267

Spurný M., Dostálek M. a Úlehla J.: Metoda kvantitativního stanovení desulfurikačních bakterií 272

Borecký L.: K otázke vírusových receptorov. O elektívnej aglutinabilite syslích erytrocytov. . . 282

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

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*
MIKROBIOLOGIE
*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus*. III.

## Krátkodobá produkce enzymu

JIŘÍ CHALOUPKA

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

*Došlo 24. 5. 1956*

Hodnocení tvorby a vylučování proteasy i jiných exoenzymů, produkovaných plísněmi a aktinomycetami, je velmi obtížné. Kultivace těchto mikroorganismů probíhá několik dní a během této doby je enzym neustále produkován. V kultivační tekutině je inaktivován (během 24 hodin o 40—60 %) a jestliže se mění v průběhu kultivace pH živného roztoku, může se měnit i rychlost inaktivace.

Snažili jsme se proto vypracovat takovou metodu produkce enzymu, která by buď odstranila nebo aspoň značně omezila inaktivaci proteasy a doplňovala tak vhodně dlouhodobé pokusy.

### *Materiál a metody*

*Kultura a kultivace.* Použitou kulturu a způsob kultivace jsme popsali v předešlé práci (Chaloupka 1956).

*Analytické metody.* Proteolytickou aktivitu jsme měřili na kaseinovém substrátě Ansonovou metodou (Anson 1938), kterou jsme upravili (Chaloupka 1955a). Kromě aktivity v kultivační tekutině jsme zjišťovali i aktivitu v mycelu po jeho rozrušení autolysou pod toluolem. Mycel, odstředěný z 10 ml kultivační tekutiny, jsme v tomto případě po promytí destilovanou vodou suspendovali v 0,5 ml $5 . 10^{-3}$ M $CaCl_2$, který stabilisoval enzym, a na povrch suspense jsme pipetou přidali 0,5 ml toluolu. Zkumavky jsme po uzátkování uložili do termostatu na 28—30 °C. Autolysa probíhala 1—3 dny, v závislosti na stáří mycelu (mladší mycel autolysuje pomaleji). Autolysu jsme vždy prováděli v několika paralelních vzorcích, které jsme v určitých časových intervalech rušili. Toluol jsme opatrně odsáli a autolysát doplnili destilovanou vodou na původní nebo poloviční objem. V takto připraveném vzorku jsme potom změřili obvyklým způsobem proteolytickou aktivitu. Měřítkem skončení autolysy bylo dosažení konstantní proteasové aktivity v autolysátě. Mycel se v průběhu autolysy rozpadl na drobně zrnitý materiál, obsahující zbytky vláken. Tento způsob rozbíjení mycelu se nám osvědčil lépe než jiné běžně používané metody jako zmrazování a rozmrazování nebo roztírání s kysličníkem hlinitým (Mc Illwain 1948).

*Příprava sušiny, barvení preparátů a měření pH* je popsáno v předešlé práci (Chaloupka 1956).

*Pracovní postup.* Aktinomycetu jsme kultivovali 48 hodin na třepačce ve Waksmanově půdě B (Waksman 1950). Mycel byl po kultivaci odstředěn ve sterilních centrifugačních zkumavkách a promyt sterilní destilovanou vodou. Promytý mycel jsme suspendovali ve vhodném objemu sterilního roztoku $5 . 10^{-3}$ M $CaCl_2$ (mycel z 200 ml kultivační půdy ve 100 ml roztoku $CaCl_2$). Suspensi mycelu jsme pipetovali po 20 ml do 500 ml varných baněk Sial, obsahujících 20 ml sterilní vody nebo roztoku živin (pepton, glukosa), nebo roztoku $2 . 10^{-3}$ M 2,4-dinitrofenolu jako inhibitoru proteosyntesy. Do všech baněk jsme potom připipetovali roztok penicilinu G a streptomycinu tak, aby konečná koncentrace penicilinu byla 300 jednotek v ml, streptomycinu 100 jednotek. Baňky jsme inkubovali obvykle 24 hod. na reciproké třepačce při 30 °C. Potom jsme po kontrole sterility zjistili proteasovou aktivitu ve svrchní tekutině i mycelu. Zjišťovali jsme i počáteční aktivitu enzymu v mycelu a sušinu před i po inkubaci.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Naměřené hodnoty proteolytické aktivity jsou průměrem ze 2—4 stanovení, hodnoty sušiny průměrem dvou vzorků. Výsledky představují typické hodnoty z řady reprodukovaných pokusů. Proteasová aktivita je ve všech případech vyjádřena v a . $10^{-4}$ miliekvivalentů na 1,0 ml enzymatického preparátu.

## *Výsledky*

Ve svých pokusech jsme používali k inhibici tvorby proteasy 2,4-dinitrofenolu v koncentraci 1 . $10^{-3}$ M. Pokusně jsme si ověřili, že tato koncentrace neovlivnila aktivitu nebo stabilitu proteasy a že zcela nebo aspoň značně brzdila tvorbu enzymu. V tabulce 1 je zachycen vliv 1 . $10^{-3}$ M dinitrofenolu na aktivitu a stabilitu proteasy. Jako zdroje enzymu jsme použili filtrátu z živné tekutiny (WB) po pětidenní kultivaci *Streptomyces griseus*, do níž byl dodatečně přidán roztok $CaCl_2$ v konečné koncentraci 5 . $10^{-3}$ M. Tento enzymatický preparát byl potom smíchán se stejným objemem dinitrofenolu (dále DNF) nebo vody a uložen jednak při + 4 °C, jednak převrstven 0,5 ml toluolu v termostatě při 37 °C. Jak vyplývá z tabulky 1, DNF neměl vliv ani na aktivitu (měřeno na počátku pokusu), ani nesnižoval stabilitu enzymu (měřeno po 24 a 72 hod.).

Tab. 1. Vliv 2,4-dinitrofenolu na aktivitu a stabilitu proteasy

| Dny | + 4 °C $H_2O$ | + 37 °C $H_2O$ | + 37 °C DNF |
|---|---|---|---|
| 0 | 21,2 | 21,2 | 21,6 |
| 1 | 19,3 | 17,2 | 20,8 |
| 3 | 22,2 | 15,9 | 15,8 |

Při zjišťování inhibice tvorby proteasy dinitrofenolem jsme inkubovali suspensi mycelu 48 hod. starého bez nebo s DNF v koncentraci 1 . $10^{-3}$ M jednak v termostatě, jednak na třepačce při 28 °C. Jak vyplývá z tabulky 2, došlo k produkci enzymu pouze za vzdušnění, t. j. při inkubaci na třepačce. Dinitrofenol v tomto pokuse inhiboval tvorbu proteasy asi z 87 %.

Tab. 2. Produkce proteasy za autolysy

| Dny | Termostat | | Třepačka | |
|---|---|---|---|---|
| | $H_2O$ | DNF | $H_2O$ | DNF |
| 0 | 2,9 | 3,2 | 2,5 | 3,2 |
| 1 | 1,5 | 3,5 | 14,5 | 2,2 |
| 2 | 2,0 | 1,5 | 35,8 | 5,5 |
| 3 | 3,3 | 2,1 | 38,0 | 8,0 |

Tab. 3. Tvorba proteasy v prvních pěti hodinách

| | 0 hod. | 5 hod. |
|---|---|---|
| Sušina v mg/ml | 5,5 | 5,5 |
| Aktivita ve svrchní tekutině | 4,3 | 5,2 |
| Aktivita v mycelu | 24,6 | 24,8 |
| Celková aktivita | 28,9 | 30,0 |

Ve snaze omezit inaktivaci enzymu během jeho tvorby na míru co nejmenší, snažili jsme se podstatně zkrátit dobu, za níž produkce enzymu probíhá. Během pěti hodin (tabulka 3) nedošlo však v přítomnosti 0,2% peptonu a 0,2% glukosy k měřitelné tvorbě proteasy.

Prodloužením doby inkubace jsme dosáhli měřitelného přírůstku proteolytické aktivity, a to jak bez přítomnosti substrátu, tak i v přítomnosti glukosy nebo glukosy s peptonem. Dinitrofenol tvorbu proteasy silně inhiboval, resp. vůbec zastavil. V tabulce 4 je zachycena produkce enzymu mycelem, vyrostlým na Waksmanově glukoso-peptonové půdě B.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

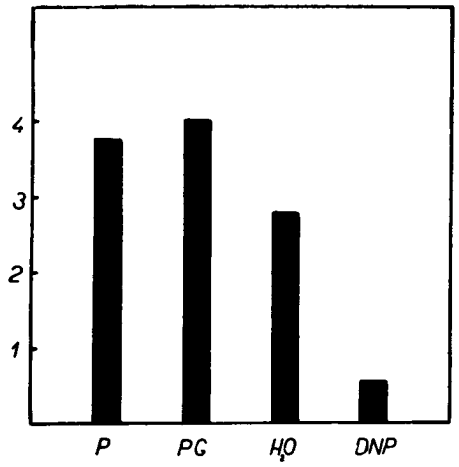
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Tab. 4. Tvorba proteasy za 24 hodin

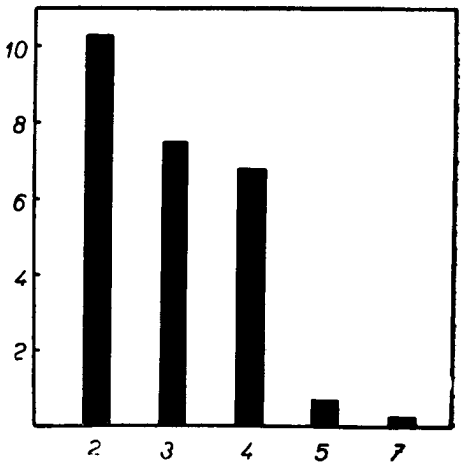
| | Počátek | Po 24 hod. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | G 0,05% | G 0,2% | PG 0,05% | PG 0,2% | $H_2O$ | DNF |
| Sušina mg/ml | 4,2 | 3,2 | 4,1 | 2,9 | 5,2 | 3,1 | 1,8 |
| pH | | 7,8 | 7,4 | 8,0 | 8,0 | 7,9 | |
| Proteol. akt. | 9,7 | 21,5 | 26,6 | 32,9 | 54,5 | 23,6 | 10,7 |
| Přírůstek za 24 hod. | | 11,8 | 16,9 | 23,2 | 44,8 | 13,9 | 1,0 |

Výsledky v tab. 4 jsou průměrnou hodnotou ze tří pokusů. G - glukosa, P - pepton, DNF - dinitrofenol.

Tvorba enzymu byla silně stimulována přítomností peptonu. Glukosa sama neměla zřetelný vliv. Rychlost autolysy, vyjádřená úbytkem sušiny, byla podstatně zvýšena přidáním dinitrofenolu. Na preparátech, připravených z baněk obsahujících suspensi mycelu ve vodě, roztoku glukosy, nebo glukosy s peptonem, byla po 24 hod. submersní kultivace zachycena vlákna grampositivní i negativní, na preparátech z baněk obsahujících DNF jen gramnegativní vlákna, většinou fragmentující a rozpadající se.




Obr. 1. Vliv media na tvorbu proteasy. P = pepton, G = glukosa, DNP = 2,4-dinitrofenol. Aktivita (osa $y$) v a . $10^{-3}$ mekv. tyrosinu v 1 ml preparátu (4,0 mg sušiny).




Obr. 2. Vliv stáří mycelu na tvorbu proteasy v destil. vodě. Osa $x$: dny, osa $y$: maximální aktivita enzymu v a . $10^{-4}$ mekv. tyrosinu na 1 mg sušiny.

Obdobným způsobem reaguje i aktinomyceta, vyrostlá na syntetické Krasiľnikovově půdě (SP 3) se středním fosforečnanem amonným jako zdrojem dusíku (obr. 1). Mycel jsme inkubovali pouze s 0,05 % roztokem peptonu i glukosy, abychom nízkou koncentrací N i C zamezili nebo alespoň silně omezili druhotný růst.

Při dlouhodobé submersní kultivaci aktinomycety na prostředí s 1 % peptonu a 1,5 % glukosy (WB) je nejvíce proteasy vylučováno do prostředí poměrně starým (víc jak 4 dny) mycelem, který autolysuje. Chtěli jsme si ověřit, zda i schopnost produkovat proteasu za autolysy v destilované vodě je vázána na starý mycel. Mycel, odstředěný po 2—7 dnech kultivace, jsme po promytí destilovanou vodou inkubovali v destilované vodě na třepačce a po 24, 48 a 72 hod. zjišťovali proteasovou aktivitu. Produkci enzymu, vztaženou na 1 mg sušiny, zachycuje obr. 2. Nejvyšší



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

produkce bylo dosaženo mycelem starým 48 hod. a je možno říci, že schopnost produkce proteasy za těchto podmínek je zhruba nepřímo úměrná stáří použitého mycelu.

*Diskuse*

Pro sledování podmínek, za nichž dochází k tvorbě a vylučování exoenzymů plísněmi a aktinomycetami, jsou obvykle dlouhodobé pokusy nedostačující, protože při nich dochází k dosti značné inaktivaci enzymu v kultivačním prostředí. Popsaná metoda krátkodobé produkce proteasy může sloužit jako doplněk těchto dlouhodobých pokusů. Její použitelnost je ovšem omezena na organismy necitlivé k běžným antibiotikům (jako jsou právě aktinomycety a plísně), protože se při ní používá antibiotik k zamezení růstu možné kontaminující mikroflory. V pokusech bez antibiotik jsme měli i při pokud možném dodržování aseptických podmínek 20—30 % kontaminací, v přítomnosti penicilinu a streptomycinu nedošlo dosud ke kontaminaci vůbec. Obě antibiotika neměla v použitých koncentracích vliv na produkci proteasy.

Výhodou metody krátkodobé produkce enzymu ve srovnání s dlouhodobými kultivacemi je kromě krátkého trvání pokusu i to, že je možno aktinomycetu inkubovat v přítomnosti vápníkových iontů, které enzym význačně stabilisují (Chaloupka 1955a). V normálně používané půdě, obsahující kromě iontů $Ca^{2+}$ i ionty $Mg^{2+}$ a $HPO_4^{2-}$, vypadává totiž většina vápníků ve formě nerozpustného fosforečnanu hořečnato-vápenatého. V krátkodobých pokusech, v nichž pracujeme s mycelem už vyrostlým, můžeme fosforečnany vypustit a tak uchováváme hladinu vápníku v prostředí na dostatečné výši. pH svrchní tekutiny bylo po 24 hod. inkubace ve všech případech prakticky totéž, takže jeho vliv na inaktivaci byl ve všech baňkách stejný.

Přírůstek enzymu během 24hodinové inkubace mycelu se substrátem jsme vypočítali po odečtení počáteční aktivity enzymu v mycelu. Dinitrofenol, který je znám jako inhibitor proteosyntesy (Frantz a sp. 1948, Borsook 1952), zabrzdil v našich pokusech tvorbu proteasy z 90—100 %. Zajímavý je jev, že autolysa aktinomycety v průběhu pokusu byla v přítomnosti dinitrofenolu podstatně rychlejší a projevila se jak značným úbytkem sušiny, tak i ztrátou grampositivity a rozpadem mycelu. Proteolytická aktivita byla však v těchto případech podstatně nižší (až 5×), a to jak v kultivačním mediu, tak ve vláknech aktinomycety. Rozpad mycelu aktinomycety nebyl tedy podmíněn přítomností proteasy, ale spíše narušením normálně probíhajících syntetických pochodů.

Popsaná metoda krátkodobé produkce enzymu je jakousi obdobou podlévání staticky vyrostlého mycelu některých plísní čerstvou živnou tekutinou, je ovšem upravena pro použití při submersním způsobu kultivace. Má určité vztahy i k metodě tvorby enzymů v tkáňových řezech, propracované Hokinem (1951a), a dalšími. Má však proti tomuto způsobu studia tvorby enzymů nevýhodu v tom, že pracuje s celým organismem, nikoli pouze s určitým specialisovaným orgánem. Na přidání živin reaguje totiž v našem případě mikroorganismus nejen tvorbou enzymu, ale i růstem a tak dochází k tvorbě enzymu podstatně později než v tkáňových řezech, kde vznikají na příklad v řezech pankreatem lipasa, ribonukleasa, amylasa a proteasa v měřitelném množství už po jedné nebo několika hodinách (Hokin 1951b, Schucher a Hokin 1954, Daly a Mirsky 1953, Rychlík a sp. 1955, Folbergová 1955).

V našich pokusech docházelo k tvorbě proteasy i při inkubaci promytého mycelu v destilované vodě bez přidání jakýchkoli živin. Svědčí to o tom, že aktinomyceta, podobně jako grampositivní bakterie, dovede hromadit proti koncentračnímu spádu ve svých buňkách aminokyseliny (Gale 1947) a využívá jich potom k tvorbě enzymu. Při dlouhodobých pokusech dochází k největší sekreci proteasy do kultivačního prostředí až v období autolysy aktinomycety, t. j. obvykle čtvrtý, pátý den a poz-



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

ději. Rovněž aktivita proteasy v mycelu je v tuto dobu nejvyšší. Naproti tomu je schopnost tvořit proteasu za submersní inkubace v destilované vodě vázána na mladší mycel, maxima jsme dosáhli s použitím mycelu starého 48 hod. Nemůžeme však dosud říci, zda tato schopnost je podmíněna vnitřním stavem mycelu (na příklad obsahem nukleových kyselin) nebo různou koncentrací asimilovatelných volných aminokyselin v buňkách.


*Souhrn*

Promytý mycel aktinomycety *Streptomyces griseus* tvoří proteasu při submersní inkubaci buď v destilované vodě nebo v přítomnosti živin. Produkce enzymu probíhá pouze za vzdušnění a je inhibována 2,4-dinitrofenolem.

Mycelium, inkubované v přítomnosti 2,4-dinitrofenolu, autolysuje podstatně rychleji než mycelium, inkubované v destilované vodě, i když obsah proteasy je v přítomnosti dinitrofenolu podstatně nižší. Mycel, získaný odstředěním po 48 hod. kultivace na glukoso-peptonové půdě, tvoří při submersní inkubaci v destilované vodě podstatně více proteasy než starší mycel.

Krátkodobá produkce enzymu může s výhodou doplňovat dlouhodobé pokusy, protože je při ní snížena inaktivace proteasy na míru co nejmenší.


Za technickou spolupráci děkuji Olze Civínové.

Literatura


Anson, M.: *Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin.* J. Gen. Physiol. 22 : 79, 1938.

Borsook, H.: *Enzymatic peptide syntheses. Their bearing on protein biosynthesis and thermodynamic considerations.* Symposium sur la biogénèse des proteines. IIe Congr. Intern. de Biochimie, Paris 1952.

Daly, M., Mirsky, A. E.: *Formation of proteins in the pancreas.* J. Gen. Physiol. 36 : 243, 1953.

Folbergová, J.: *Vliv iontů na tvorbu lipasy v tkáňových řezech pankreatu.* Diplomová práce, Praha 1955.

Frantz, J. D. J., Zamecnik, P. C., Reese, J. W., Stephenson, M. L.: *The effect of dinitrophenol on the incorporation of alanine labelled with radioactive carbon into the proteins of slices of normal and malignant rat liver.* J. Biol. Chem. 174 : 773, 1948.

Gale, E. F.: *The assimilation of amino acids by bacteria. I. The passage of certain amino acids across the cell wall and their concentration in the internal environment of Streptococcus faecalis.* J. Gen. Microbiol. 1 : 53, 1947.

Hokin, L. E.: *The synthesis and secretion of amylase by pigeon pancreas in vitro.* Biochem. J. 48 : 320, 1951 a.

Hokin, L. E.: *Amino acid requirements for amylase synthesis by pigeon pancreas slices.* Biochem. J. 50 : 126, 1951 b.

Chaloupka, J.: *Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus.* Čs. biologie 2 : 206, 1955 a.

Chaloupka, J.: *Tvorba a vylučování proteasy aktinomycetou Streptomyces griseus.* Disertační práce, Praha 1955 b.

Chaloupka, J.: *Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus II. Vliv povahy a koncentrace dusíku na sekreci proteasy.* Čs. mikrobiologie 1 : 32, 1956.

Mc Ilwain, H.: *Preparation of cell-free bacterial extracts with powdered alumina.* J. Gen. Microbiol. 2 : 288, 1948.

Krasiľnikov, N. A.: *Aktinomycety — antagonisté a antibiotické látky.* Český překlad, Praha 1953.

Rychlík, J., Švejcar, J., Šorm, F.: *Sintez proteaz i amilazy v podželudočnoj železe myši in vitro.* DAN SSSR 104 : 284, 1955.

Schucher, R., Hokin, L. E.: *The synthesis and secretion of a lipase and ribonuclease by pigeon pancreas slices.* J. Biol. Chem. 210 : 551, 1954.

Waksman, S. A.: *The actinomycetes.* Waltham 1950.




Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

## Протеолитические энзимы актиномицета Streptomyces griseus. III.

### Краткосрочная продукция энзима

*Ю. Халоупка*

Резюме

Отмытый мицелий лучистого грибка Streptomyces griseus образует протеазу при глубинной культивации как в дестиллированной воде, так и в присутствии питательных веществ. Продукция энзима осуществляется только при аэрации и подавляется 2,4-динитрофенолом, в присутствии которого мицелий подвергается автолизу значительно быстрее, чем в дестиллированной воде, хотя содержание протеазы в присутствии 2,4-динитрофенола бывает гораздо ниже. Мицелий, получаемый путем центрифугирования 48-часовой культуры на глюкозопептонной среде, образует при глубинной инкубации в дестиллированной воде гораздо больше протеазы, чем более старый мицелий. Краткосрочная продукция энзима может служить удобным дополнением длительных опытов, так как при ней инактивация протеазы снижается до минимума.

## Proteolytic Enzymes of the Actinomyces Streptomyces griseus. III.

### Sho t-term Production of the Enzym

*J. Chaloupka*

Summary

On submerged incubation in distilled water or in the presence of nutrients, the washed mycelium of the actinomyces Streptomyces griseus forms a protease. The enzyme is produced only in conditions of aeration and is inhibited by 2,4-dinitrophenol. The mycelium incubated with 2.4-dinitrophenol autolyses far more rapidly than the mycelium incubated in distilled water, even though the protease content is considerably lower in the presence of dinitrophenol. The mycelium obtained by centrifugation after 48 hours' culturing on a glucose-peptone medium forms considerably more protease than an older mycelium submerged in distilled water. The short-term production of the enzyme is useful for supplementing long-term experiments, because in this way inactivation of the protease is reduced to the lowest possible degree.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Štúdium Harden-Youngovho efektu u kvasiniek. I.

## Voľba vhodných podmienok

ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, ANNA GEBAUEROVÁ a MARGITA HRDINOVÁ

Slovenska akadémia vied, Chemický ústav, oddelenie glycidov a biochemie, Bratislava

*Došlo 2. 2. 1956*

Pri kvasení za použitia intaktných sušených kvasiniek, maceračných šťiav alebo rôznych plazmolytík sa pozoruje Harden-Youngov efekt. Je charakterizovaný nahromadením fosforylovaných esterov cukrov, najmä fruktóza-1,6-difosforečnej kyseliny a znížením kvasenia hlavne po vyčerpaní voľnej kyseliny fosforečnej a voľného cukru.

Harden-Youngovho efektu sa prakticky využíva už dlho k nahromaďovaniu fosforylovaných esterov cukrov a k ich izolácii, nakoľko čiste chemická syntéza týchto látok nie je snadná. Ačkoľvek má tento efekt svoje praktické využitie a bol častejšie študovaný, nebola jeho príčina dlho objasnená. Len v roku 1949 Meyerhof dokázal experimentálne, že príčinou Harden-Youngovho efektu je inaktivácia enzymu „apyrázy" — je to fosfatáza, katalyzujúca odštepovanie dvoch zvyškov kyseliny fosforečnej od ATP. Doplnil kvasničné prípravky, javiace inokedy Harden-Youngov efekt, zemiakovou apyrázou a zistil, že obvyklý úkaz sa neobjavil. Dostavil sa znovu, ak sa pridali inhibítory apyrázy. V citovanej práci autor dokázal, že vyrobením enzymatických kvasničných prípravkov ultrazvukom alebo zmrazením sa môže Harden-Youngovmu efektu predísť. Kvasničná apyráza je rôzne citlivá u sušených kvasníc ako u prípravkov tekutých. Avšak ani jednotlivé plazmolytiká nejavila jednotný účinok. Toluén patrí k najčastejšie používaným plazmolytikom a preto bol tiež často podrobený kritike. Tak Buchsteeg (1942) doporučuje presne vyskúšať vhodnú dávku toluénu, pretože nemusí pôsobiť vždy len inhibične, avšak môže byť aj neúčinný, alebo môže dokonca aj stimulovať. Asheshov a Giaja (1923) zistili, že 2 % toluénu zachovávajú metabolizmus kvasničných buniek nezmenený. Meyerhof (1949) docielil riadnú inhibíciu oktylalkoholom, fenyluretánom, menšiu potom dodecylalkoholom a najmenšiu digitonínom.

Zaoberali sme sa porovnávaním priebehu fosforylácie za použitia rôznych enzymatických prípravkov, rôznych plazmolytík, ako aj rôznych kvasníc. Pri tom sme venovali bližšiu pozornosť obsahu hydrolyzovateľného fosforu, nakoľko cieľom práce bolo nahromadiť čo najväčšie množstvo fosforylovaných esterov cukrov.

### *Materiál a metódy*

*Kvasinky a enzymatické preparáty.* Používali sme obchodné lisované pekárske droždie a husté pivovarské várečné kvasnice zo závodu 1 Západoslovenských pivovarov v Bratislave. Enzymatické preparáty boli pripravené ako sušené intaktné kvasnice, acetónový prášok „zymín" a Lebedevova šťava (cit. Kocková-Kratochvílová 1954a, b). Priebeh kvasenia sme stanovili zavádzaním vznikajúceho kysličníka uhličitého do barytovej vody (Kocková-Kratochvílová 1954a) a spotrebovanú glukózu podľa zvyškovej glukózy redukciou Fehlingovho roztoku. Sušina kvasníc sa stanovila riedením a sušením pri 105 °C.

*Stanovenie fosforu.* Priebeh fosforylácie sme sledovali podľa ubúdania anorganického fosforečnanu v reagujúcej zmesi. Fosfor sme stanovili kolorimetricky podľa Bella a Doisyho (cit. Kocková-Kratochvílová 1954a). Vyhodnocovanie výsledkov bolo prevádzané kalibračnou krivkou podľa mg fosforu. Fosfor v rôznych väzbách uvádzame ako organický, anorganický, fosfoproteidový a pod., dovedna hovoríme o fosfore celkovom.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Fosfor celkový sme stanovovali po mineralizácii spalovaním v koncentrovanej kyseline sírovej za použitia katalyzátora 30 % hydroperoxydu. Pred stanovením bola vzorka zriedená, pH upravené a všetko doplnené na určitý vhodný objem. Anorganický fosfor sme stanovili vo filtráte po vyzrážaní bielkovín 10% roztokom kyseliny trichlóroctovej. Organický fosfor sme vypočítali z rozdielu medzi fosforom celkovým a anorganickým. Fosfoproteidový fosfor sme určili v zrazenine po vyzrážaní kyselinou trichlóroctovou. V tuku rozpustný fosfor sme stanovili po extrakcii alkoholom. Hydrolyzovateľný fosfor sme zisťovali po hydrolýze n HCl pri 100 °C a to rôzne dlho trvajúcej: 7,10, 30, 60 a 180 minút. V literatúre sa uvádza (Bamann a Myrbäck 1941), že za sedem minút sa hydrolyzuje všetok pyrofosforečnan, Wiame (1949) hovorí pri tom tiež o metafosforečnanu, za 10 minút sa hydrolyzuje všetka glukózo-1-fosforečná kyselina, za 30 minút fruktóza-1-fosforečná kyselina, za 60 minút triózový fosforečnan a za 180 minút vyšše 90 % fruktóza-1,6-difosforečnej kyseliny.

*Pracovný postup.* Pri fosforylácii sme dodržiavali rovnaké podmienky. Vychádzali sme pri tom z predpisov Bernhauera (1932). Pridávali sme 50 g glukózy a toľko primárneho alebo sekundárneho fosforečnanu draselného, aby množstvo fosforu tvorilo 775 mg na 100 ml. Kvasinky boli pri tom tak riedené, že sušina v 100 ml tvorila 43,5 g. Celkový objem tekutiny bol 1000 ml. Zmes bola počas fosforylácie pravidelne miešená elektrickou miešačkou.

## *Výsledky a diskusia*

Kvasnice, ktoré sme používali, sme podrobili najskôr rozboru, ktorého výsledky uvádzame v tab. 1.

Tab. 1. Rozbor použitých pivovarských kvasníc a pekárskeho droždia

| Zloženie v % sušiny | I „Plzeň"/VII z tmavej mladiny | II „Plzeň"/VII zo svetlej mladiny | III „Plzeň"/IX zo svetlej mladiny | IV Predajné pekárske droždie |
|---|---|---|---|---|
| Celkový N | 8,5 | 8,4 | 8,8 | 7,2 |
| Celkový P | 3,27 | 3,01 | 2,2 | 0,52 |
| Anorganický P | 0,42 | 0,48 | 0,63 | 0,093 |
| Organický P | 2,85 | 2,53 | 1,59 | 0,427 |
| Hydrolyzovateľný P | 0,162 | 0,154 | 0,260 | 0,026 |
| Fosfoproteidový P | 0,55 | 0,63 | 0,71 | 0,39 |

Tab. 2. Zbytkový cukor po prekvasení rôznymi enzymatickými preparátmi

| Kvasnice | Zvyšná glukóza v g na 100 ml |
|---|---|
| Čerstvé | 0,372 |
| Plazmolyzát | 1,789 |
| Zymín | 2,64 |
| Maceračná šťava | 3,31 |

Tab. 3. Prehľad hydrolyzovateľného fosforu v mg na 10 g sušených kvasníc na konci pokusu za použitia rôznych enzymatických prípravkov

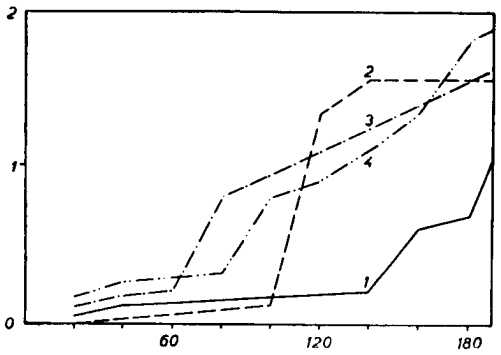
| Doba hydrolýzy | Maceračná šťava | Zymín | Plazmolyzát |
|---|---|---|---|
| 7 minút | 8,13 | 3,15 | 2,40 |
| 10 minút | 15,92 | 3,22 | 2,45 |
| 30 minút | 17,44 | 3,47 | 2,95 |
| 60 minút | 19,42 | 3,56 | 3,20 |
| 180 minút | 20,70 | 3,89 | 3,56 |

Z pekárskych kvasníc sme pripravili tri rôzne prípravky: zymínový prášok, maceračnú šťavu a plazmolyzát za použitia toluénu. Porovnali sme najprv ich kvasivú schopnosť spolu s normálnym kontrolným kvasením na substráte z glukózy a fosforečnanu o uvedenom pomere. Priebeh tohoto kvasenia znázorňuje obr. 1. Konečné prekvasenie sme vyjádrili množstvom zvyšného cukru, redukujúceho Fehlingov roztok, v prepočítaní na glukózu (tab. 2).

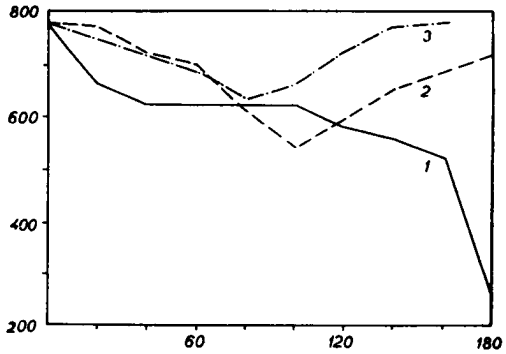


Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

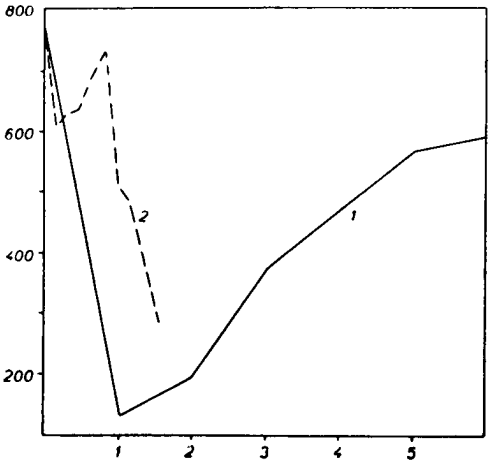
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9



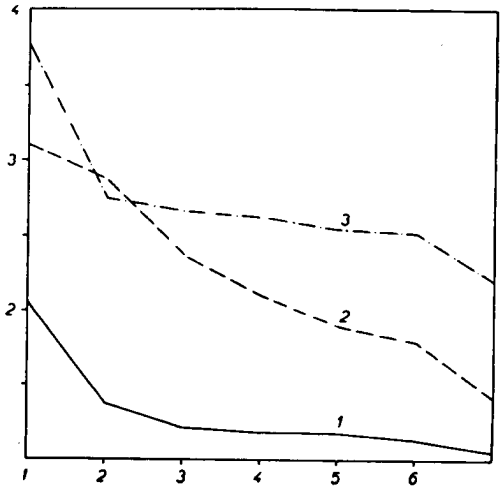

Obr. 1. Priebeh kvasenia u rôznych prípravkov z pekárského droždia. Os $x$: čas v minutách, os $y$: $CO_2$ v g. 1 - maceračná šťava (zvyšná glukóza 3,31%), 2 - zymín (zvyšná glukóza 2,64%), 3 - plazmolyzát (zvyšná glukóza 1,79 %), 4 - čerstvé kvasnice (zvyšná glukóza 0,37 %).




Obr. 2. Celkový priebeh fosforylácie u rôznych prípravkov z pekárskeho droždia. Os $x$: čas v minutách, os $y$: fosfor v mg v 100 ml zmesi. 1 - maceračná šťava, 2 - zymín, 3 - plazmolyzát.




Obr. 3. Priebeh fosforylácie u intaktného sušeného pekárskeho droždia. Os $x$: čas v hodinách, os $y$: fosfor v mg v 100 ml zmesi. 1 - zaznačované v hodinových intervaloch, 2 - zaznačované v desaťminutových intervaloch.




Obr. 4. Priebeh kvasenia podľa zvyšnej glukózy. Os $x$: čas v hodinách, os $y$: zvyšná glukóza v g v 100 ml zmesi. 1 - 10 % syrupu, 2 - 15 % syrupu, 3 - 20 % syrupu.

Celkový priebeh fosforylácie je na obr. 2. Ukázalo sa, že maximum fosforylácie je rôzne, objavuje sa u plazmolyzátu už za 80 minút, u zymínu za 100 minút a u maceračnej šťavy prebiehala fosforylácia síce zvoľna, avšak až do konca pokusu. Tak množstvo hydrolyzovateľného fosforu bolo u tohoto prípravku najväčšie, lebo sme ho stanovili až po skončení pokusu (tab. 3).

Obsah hydrolyzovateľného fosforu v reakčnej zmesi by bol býval tiež vyšší u zymínu a plazmolyzátu, keby bol býval stanovený v okamihu ich maximálnej fosforylácie. Takto sa približne rovná len obsahu metafosforečnanov v pôvodných



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

kvasniciach. V zymíne ani v plazmolyzáte v tomto pokuse nie sú apyráza a ostatné fosfatázy celkom inaktivované.

Pripravili sme tiež z týchto pekárskych kvasníc intaktné sušené kvasnice (Kocková-Kratochvílová 1954b) a sledovali sme priebeh fosforylácie po jednohodinových intervaloch. Obr. 3 ukazuje, že tu beží fosforylácia rýchle, už počas 1—2 hodín a potom dochádza k defosforylácii.

Tab. 4. Prehľad priebehu fosforylácie a množstvo zvyšnej glukózy v prostredí pri rôznych dávkach toluénu

| Doba odoberania vzorky po hodinách | Dávka toluénu | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 % | | 6 % | | 10 % | |
| | fosfor v mg % | glukóza v % | fosfor v mg % | glukóza v % | fosfor v mg % | glukóza v % |
| 0 | 775 | 5 | 775 | 5 | 775 | 5 |
| 1 | 630 | 2,48 | 680 | 3,06 | 492 | 2,85 |
| 2 | 580 | 2,04 | 673 | 3,06 | 456 | 2,74 |
| 3 | 560 | 1,47 | 516 | 2,61 | 432 | 2,35 |
| 4 | 540 | 1,81 | 542 | 2,01 | — | 0,95 |
| 5 | 99 | 2,22 | 293 | 1,56 | — | 0,46 |
| 6 | 580 | 2,14 | — | 1,06 | — | 0,41 |
| 7 | 640 | — | — | — | — | — |

Tab. 5. Prehľad priebehu fosforylácie a množstvo zvyšnej glukózy pri rôznej teplote

| Doba odoberania vzorky po hodinách | Teplota 25 °C | | Teplota 37 °C | |
|---|---|---|---|---|
| | mg % fosforu | % glukózy | mg % fosforu | % glukózy |
| 0 | 775 | 5 | 775 | 5 |
| 1 | 676 | 1,46 | 456 | 1,21 |
| 2 | — | 0,44 | — | 0,16 |
| 3 | — | 0,25 | — | 0,09 |
| 4 | — | 0,07 | 52 | — |
| 5 | — | — | 136 | — |

Odoberaním vzoriek po 10minutových intervaloch sme obdržali podrobnejší priebeh. Zistili sme, že tu dochádza počas prvých 50 minút k nepravidelnosti a iba potom nastupuje riadná fosforylácia. Oneskorenie maxima fosforylácie si vysvetlujeme o 24 hodín dlhším uskladnením prípravku. Zdá se, že tento výkyv vo fosforylačnom priebehu súhlasí s výkyvom, na ktorý upozorňuje Nielsen (1941). Dostával výkyvy, spôsobené vplyvom fosforečnanu v poločase kvasenia intaktnými sušenými preparátmi. Zistili sme, že zvyšná glukóza za dobu 50 minút priebehu bola 2,29 g v 100 ml reagujúcej zmesi. V tej dobe bolo z celého pokusu spotrebované 390 mg fosforu a 27,1 g glukózy. Viaže sa teda do esterovej väzby s cukrom podľa Harden-Youngovej rovnice len 0,012 mol kyseliny fosforečnej. Na prekvasenie ostáva 0,138 mol glukózy, čo odpovedá 24,84 g glukózy z celého pokusu, teda približne polovica z pôvodných 50 g. Doba 50 minút, kedy dochádza k maximu výkyvu v našom pokuse, by odpovedala tiež poločasu kvasenia.

Z praktických dôvodov sme obrátili pozornosť k pivovarským kvasniciam. Forma, v akej sme ich z pivovaru dostávali, vyhovovala len príprave plazmolyzátov. Z plazmolytík sme vyskúšali toluén, éter, oktylalkohol, fenylizotiokyanatan a alylizotiokyanatan. Podrobnejšie sme sa venovali skúmaniu účinku toluénu, s ktorým



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

sme chceli previesť všetky orientačné pokusy. K prvým patrilo vyskúšanie rôznych dávok toluénu a teplôt pri pokuse, ako ukazuje tab. 4. Tieto prvé orientačné pokusy ukázali, že čím je vyššia dávka toluénu, tým beží fosforylácia rýchlejšie a tým viacej sú inaktivované fosfatázy.

Ďalšie pokusy s dvomi rôznymi teplotami pri 10% obsahu toluénu ukázali, že zvýšenie teploty značí urýchlenie fosforylácie (tab. 5).

Pri zvýšenej teplote dochádza aj k hydrolytickej činnosti preparátu. Pri našich ďalších pokusoch sme volili radšej nižšiu teplotu, 20—22 °C, a 6 % toluénu, aby priebeh nebol tak rýchly a aby sme maximum fosforylácie tak snadno nezameškali. Vypočítaná doba 5 hodín priebehu sa nám javila za týchto okolností vhodnou k hodnoteniu fosforylácie podľa obsahu hydrolyzovateľného fosforu.

Tab. 6. Priebeh fosforylácie v nerušenom systéme a v oktylalkoholovom plazmolyzáte

| Doba odoberania vzorky po hodinách | Bez plazmolytika | | | 6 % oktyl-alkoholu |
|---|---|---|---|---|
| | 10 % syrupu | 15 % syrupu | 20 % syrupu | 20 % syrupu |
| 0 | 775 | 775 | 775 | 775 |
| 1 | 764 | 765 | 748 | 766 |
| 2 | 748 | 700 | 714 | 721 |
| 3 | 716 | 680 | 710 | 704 |
| 4 | 698 | 652 | 668 | 705 |
| 5 | 694 | 640 | 652 | 700 |
| 6 | 664 | 632 | 612 | — |

Tab. 7. Prehľad hydrolyzovateľného fosforu za použitia rôznych plazmolytík, vyjádrené v mg fosforu na 1 g sušiny kvasníc

| Doba hydrolýzy v min. | Pôvodné vzorky kvasníc | | 6 % toluén II | 6 % oktyl-alkohol II | 6 % toluén pre-vzduš-ňované II | 0,1 ml alylizotio-kyanatanu 0,01 % | | 0,1 ml fenyl-izotiokya-natanu 0,2 % I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | | | | po pre-kvasení I | bez prekva-senia I | |
| 7 | 6,48 | 6,43 | 12,56 | 11,18 | 11,20 | 12,06 | 19,16 | 6,5 |
| 10 | 8,96 | 9,46 | 13,02 | 11,71 | 11,59 | 12,27 | 19,28 | 6,65 |
| 30 | 13,89 | 13,37 | 13,91 | 12,63 | 11,70 | 12,20 | 20,87 | 5,62 |
| 60 | 15,91 | 16,41 | 14,45 | 13,91 | 11,69 | 12,23 | 20,43 | 6,07 |
| 180 | 16,25 | 18,94 | 15,09 | 15,82 | 11,85 | 12,50 | 20,41 | 6,95 |

Tiež éter sme použili ako plazmolytikum, avšak sa neosvedčil, lebo brzdil takmer celý priebeh fosforylácie už v začiatkoch. Pridanie 60% oktylalkoholu, aby plazmolyzát stekutil, brzdilo riadný priebeh fosforylácie. Potvrdzuje to len Meyerhofove tvrdenie, že v tekutých plazmolyzátoch oktylalkohol neinaktivuje apyrázu. Porovnali sme preto oktylalkoholový plazmolyzát s neporušeným čerstvým systémom. Miesto glukózy sme použili škrobový syrup v rôznych koncentráciach, 10, 15 a 20%. (Úbytok glukózy viď obr. 4, tab. 6.)

Tak ako je k prejaveniu Harden-Youngovho efektu treba inaktivovať apyrázu, tak je tiež dôležité, aby pri tom nebola inaktivovaná fosforyláza, ktorá katalyzuje vstupnú väzbu kyseliny fosforečnej na glukózu, teda hexokináza. K posúdeniu



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

priebehu fosforylácie za súčasnej inaktivácie hexokinázy sme použili izotiokyanatany. Izotiokyanatany blokujú aktívne skupiny -SH hexokinázy. V prvom pokuse sme použili 0,1 ml 0,2% syntetického fenylizotiokyanatanu. Fosforylácia síce slabo prebiehala, avšak hydrolyzovateľný fosfor si zachoval približne rovnakú hladinu v každom čase o takej hodnote, ako metafosforečnany pôvodných kvasníc (tab. 7). Z toho možno usudzovať, že esterifikácia vôbec neprebiehala pre dôkladnú inaktiváciu hexokinázy. Pri pokusoch mimo rámca tejto práce s alylizotiokyanatanom sme zistili, že v niektorých malých koncentráciach pôsobí dráždivo. Opakovali sme preto pokus s 0,1 ml 0,01% alylizotiokyanatanu na 1000 ml zmesi, a to v dvoch rôznych usporiadaniach: jedna séria bola nechaná najprv prekvasiť a druhá mala hneď od samého začiatku pridaný alylizotiokyanatan. Po piatich hodinách bol stanovený hydrolyzovateľný fosfor. V pokusoch vopred neprekvasených dosiahol hydrolyzovateľný fosfor najvyššej hodnoty zo všetkých robených pokusov.

Tab. 8. Prehľad priebehu fosforylácie u rôznych prevádzkových generácií pivovarských kvasníc, vyjadrené v mg % fosforu

| Doba odoberania vzorky po hodinách | Generácia v prevádzke | | |
|---|---|---|---|
| | tretia | piata | šiesta |
| 0 | 775 | 775 | 775 |
| 1 | 498 | 520 | 530 |
| 2 | 438 | 478 | 528 |
| 3 | 452 | 414 | 506 |
| 4 | 340 | 309 | 502 |
| 5 | 190 | 166 | 309 |

Tab. 9. Spotrebovaný fosfor v mg % u rôznych laboratórnych generácií pivovarských kvasiniek

| Laboratórna generácia | Spotrebovaný fosfor |
|---|---|
| 1. | 523 |
| 2. | 419 |
| 3. | 73 |
| 4. | 155 |
| 5. | 328 |

Tab. 10. Prehľad fosforylácie u rôznych čistých kultúr pivovarských kvasiniek

| Doba odoberania vzorky po hodinách | Anorganický fosfor v mg % | | | Zvyšková glukóza v % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | P 1 | P 11 | P 17 | P 1 | P 11 | P 17 |
| 0 | 775 | 775 | 775 | 5 | 5 | 5 |
| 1 | 372 | 378 | 319 | 2,05 | 1,96 | 1,28 |
| 2 | 346 | 342 | 299 | 1,42 | 1,54 | 1,66 |
| 3 | 354 | 337 | 295 | 1,56 | 1,63 | 1,82 |
| 4 | 391 | 392 | 291 | 2,15 | 2,05 | 1,61 |
| 5 | 408 | 404 | 297 | 1,40 | 1,78 | 1,40 |
| 6 | 428 | 410 | 314 | 2,33 | 2,01 | 1,19 |

K uceleniu našej orientácie sme vyskúšali tiež rôzne prevádzkové generácie pivovarských kvasníc a tiež kmene s rôznou morfologickou a fyziologickou charakteristikou (tab. 8). Zdá sa, že pri viac raz nasadených kvasniciach sa tiež oslabí ich schopnosť fysforylácie. Opakovali sme tento pokus s čistými kultúrami pivovarských kvasníc, pomnožených v laboratóriu za rovnakých podmienok. Prvú kultúru sme vypestovali v prostředí bez anorganického fosforečnanu. Túto fosforom hladoviacu kultúru sme pomnožovali v sladine z tej istej kmeňovej várky. Fosforyláciu sme hodnotili obvyklým spôsobom a hodnoty anorganického fosforu sme porovnávali po piatich hodinách (tab. 9). Pokus ukazuje, že fosforom vyhladovelé kvasnice javia najväčšiu schopnosť viazať anorganický fosfor z prostredia. Avšak kvasnice, vedené už niekoľko generácií vo výživnom prostredí, vykazujú po rovnakej dobe



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

najmenšie množstvo organicky viazaného fosforu. Ich fyziologická činnosť je pravdepodobne sústredená na hlbšie prekvasovanie. To je tiež v súhlase s praksou, kde sa ukázalo, že tretia až piatá prevádzková generácia vyhovuje najlepšie.

V čistých kultúrach, pestovaných v laboratóriu, sme preskúšali tiež tri typicky rôzne pivovarské kmene: P 1 (pôvodom z pivovaru v Prahe XVI) ako veľké podlhovasté bunky, P 11 (pôvodom z pivovaru v Lounoch) ako malé guľaté bunky, P 17 (pôvodom z pivovaru v Budejoviciach) ako veľké guľaté bunky (tab. 10, Kocková-Kratochvílová, Vavruchová a Nováková 1951). Pokus ukázal, že najmohutnejšia fosforylácia je u kmeňov s veľkými guľatými bunkami a najmenšia u kmeňov s bunkami podlhovastými. Naproti tomu aktivita fosfatáz je najväčšia u kmeňov s bunkami oválnymi a najpomalšia u kmeňov s veľkými a guľatými bunkami. Najhlbšie prekvasujú kmene s veľkými guľatými bunkami a najslabšie kmene podlhovasté.

*Súhrn*

V tejto práci sme porovnávali podmienky vyvolania Harden-Youngovho efektu a ako cieľ práce sme sledovali najlepšie nahromadenie fosforylovaných esterov cukrov pre izolačné pokusy. Najlepšie sa pri tom osvedčila kombinácia intaktných sušených kvasníc s plazmolytikom. Intaktné sušené kvasnice samy vyvolávajú nepravidelnosť, ktorá sa javí v poločase kvasenia, ako sme zistili pri podrobnejšom rozbore reagujúcej zmesi. Plazmolytikum samo nemusí vždy vyvolať Harden-Youngov efekt. Podarilo sa nám vyvolať uspokojivý efekt malou dávkou izotiokyanatanov. Táto dávka musí byť tak malá a presne vyskúšaná, aby nestačila blokovať tiólové skupiny hexokinázy. Tento spôsob sa hodí dobre pre pivovarské kvasnice, ktoré sa pre ten účel nemusia vysušovať. Izotiokyanatany majú ešte tu výhodu, že sa dajú snadno odstrániť zo zmesi pre svoju tekavosť, čo ostatné plazmolytiká nemajú. Najlepšia sa hodia pivovarské kvasnice hlboko prekvášujúce, vyprané a uložené pod čistou vodou vo vaniach. Podstupujú tu obdobie hladovania fosforom, čo im umožňuje pri uvedenom postupe fosforylácie rýchlejšie viazať anorganický fosforečnan z reakčnej zmesi. Sú výhodnejšie ako pekárske kvasnice, ktoré hromadia niekoľko raz menej hydrolyzovateľného fosforu.

Literatúra

Asheshov, I. N., Giaja, J.: *Sur la survie de la levure toluénisée.* C. R. Soc. Biol. Paris, 89 : 123, 1923.
Bamann, E., Myrbäck, K.: *Methoden der Fermentforschung.* Lipsko 1941.
Bernhauer, K.: *Gärungschemisches Praktikum.* Berlin 1932.
Buchsteeg, W.: *Über den Einfluss und die Wirkungsweise von Toluol auf Bakterienzelle.* Zbl. Bakter. II. 105 : 209, 1942.
Kocková-Kratochvílová, A.: *Praktikum technické mikrobiologie.* Praha 1954a.
Kocková-Kratochvílová, A.: *Enzymatické systémy v glycidovém metabolismu kvasinek.* Zborník zo zjazdu chemikov, sekcia biochemicko-potravinárska, Bratislava 1954 b.
Kocková-Kratochvílová, A., Vavruchová, A., Nováková, D.: *Význam správného pěstování technických mikroorganismů.* Průmysl potravin 7 : 305, 1951.
Meyerhof, O.: *Further studies of the Harden-Young effect in alcoholic fermentation of yeast preparations.* J. Biol. Chem. 180 : 575, 1949.
Nielsen, R.: Bamann, E., Myrbäck, K.: Cit. 1941.
Wiame, J. M.: *The occurance and physiological behavior of the metaphosphate fractions in yeast.* J. Biol. Chem. 178 : 919, 1949.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

## Изучение эффекта Harden Young-а у дрожжей. I.

### Выбор удобных условий

*А. Кокова-Кратохвилова, А. Гебауерова и М. Грдинова*

Резюме

В настоящей работе исследовались условия возникновения эффекта Harden Young-а, при котором наблюдается накопление фосфорилированных эстеров сахаров. Наиболее благоприятные результаты давала комбинация ненарушенных сушеных дрожжей с плазмолитиком. Одни только ненарушенные сушеные дрожжи вызывают неправильности, достигающие максимума в половине времени брожения. Сам по себе плазмолитик невсегда обязательно инактивирует апиразу. Нам удавалось вызвать удовлетворительный эффект Harden Young-а с помощью небольшой дозы изотиокианатов. Однако эта доза должна быть настолько мала, чтобы она не была способна блокировать тиоловые группы гексокианазы. Этот способ вполне пригоден для пивных дрожжей, которые с этой целью не нужно сушить. Изотиокианаты имеют еще и то преимущество, что их легко устранить из смеси ввиду их летучести, чего нет у остальных плазмолитиков. Для того, чтобы вызвать эффект Harden Young-а, отлично подходят нижнебродящие пивные дрожжи для глубинного сбраживания, промытые и хранимые в ваннах с чистой водой. Здесь они подвергаются в течение некоторого времени фосфорному голоданию, что позволяет им (при этом способе фосфорилирования) быстрее связывать анорганический фосфат из питательной среды. Пивные дрожжи удобнее, чем пекарные, которые накапливают в несколько раз меньше гидролизирующегося фосфора.

## Study of the Harden Young Effect in Yeasts. I.

### Choice of Suitable Conditions

*A. Kocková-Kratochvílová, A. Gebauerová and M. Hrdinová*

Summary

A study was made of the conditions of the development of the Harden Young effect, in which accumulation of phosphorylated sugar esters occurs. The best has proved to be a combination of intact, dried yeasts, together with a plasmolytic. Intact, dried yeasts alone produce irregularity, which reaches its peak at the half-time of the yeast fermentation. The plasmolytic alone does not always inactivate apyrase. We succeeded in producing a satisfactory Harden Young effect with a small dose of isothiocyanate. The dose must, however, be small enough not to cause blocking of the —SH groups of hexokinase. This method is very satisfactory for brewer's yeast, which does not need to be dried for the purpose. Isothiocyanates have the further advantage that they can easily be removed from the mixture because of their volatility, which is not the case with the other plasmolytics. Deeply fermenting brewer's yeast, washed and placed in baths in clean water, is an excellent medium for producing the Harden Young effect. It undergoes a period of phosphorus deficiency which, with the manner of phosphorylation described, enables it to bind the inorganic phosphorus from the medium more rapidly. It is more suitable than baker's yeast, which accumulates several times less hydrolyzable phosphorus.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Význam fermentačních podmínek pro produkci penicilinu kmenem *Penicillium chrysogenum* 51-20

VLASTA MATELOVÁ a JAN NEČÁSEK

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

*Došlo 22. 5. 1956*

Produktivita kmene je jedním ze základních činitelů, který rozhoduje při výrobě antibiotik o výtěžnosti fermentačního postupu. K šlechtění produkčních kultur se používá selekčních metod, spojených zpravidla s aplikací silně působících činitelů.

Základní kulturou, ze které byly postupně vyšlechtěny všechny kmeny, používané v průmyslové výrobě penicilinu, byl kmen *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (Anderson a sp. 1953, Johnson 1952, Stauffer a Backus 1954). Širokého uplatnění v provozu došly zejména kmeny Q 176, 49—133 a 51—20. Stauffer a Backus (1954) uvádějí produkce 435 j./ml pro kmen Q 176, 1519 j./ml pro kmen 49—133 a 1934 j./ml pro kmen 51—20. Nutno poznamenat, že tyto výsledky jsou laboratorní. O produkční výši, které bylo dosahováno jednotlivými kmeny za provozních podmínek, nelze z literatury získat žádné informace. Pouze v poslední práci o penicilinových kmenech uvádí Tornqvist a Peterson (1954) poloprovozní výsledky, a to 2000 j./ml pro kmen 49—133; pro kmen 51—20 je udána produkce o 30 % vyšší.

V roce 1954 jsme propracovali ve Výzkumném ústavu antibiotik podmínky pro fermentaci kmenem 49—133, kterým jsme nahradili předchozí kulturu 47—1564/53. Po získání kmene 51—20 bylo naším úkolem vypracovat laboratorní postup fermentace s tímto kmenem jako podklad tankové fermentační technologie. Při této práci jsme kromě jiných poznatků, na příklad zahraničních zkušeností, týkajících se zejména složení živných půd, využívali výsledků, získaných při vývoji laboratorního fermentačního postupu pro kmen 49—133.

## *Materiál a metody*

*Kmeny a jejich uchovávání.* Konservy kmenů 49—133 a 51—20 jsme připravovali na směsi zeminy a písku a uchovávali při teplotě laboratoře.

*Příprava sporového inokula.* Konservu jsme naočkovali na šikmý agar ve zkumavce se sporulační půdou S. Inkubační doba pro kmen 49—133 je pět dnů, pro kmen 51—20 čtyři dny. Kultivace probíhaly při teplotě 25 °C. První sporulační generací (suspensí spor) jsme očkovali Rouxovy lahve se sporulační půdou S. Doba a teplota kultivace je obdobná jako při kultivaci prvé sporulační generace. První a druhou sporulační generaci přechováváme u obou kmenů při teplotě — 18 °C 4 týdny.

*Technika laboratorní fermentace.* Vegetativní inokulum jsme připravovali na rotační třepačce (240 obr./min., průměr kružnice 5 cm) v 500 ml varných baňkách s 80 ml příslušné půdy. Inkubační doba byla odvislá od užitého fermentačního postupu. Baňky pro kultivaci vegetativního inokula jsme očkovali vždy sporovou suspensí z druhé sporulační generace, vyjma u pokusů, v nichž jsme sledovali závislost produkce na počtu sporulačních generací. Vegetativní inokulum jsme kultivovali při teplotě 25 °C. Vypěstovaného inokula jsme používali zpravidla čerstvého, maximálně 2 dny starého. Při třístupňové fermentaci jsme druhou vegetativní generaci opět kultivovali na rotační třepačce v 500 ml varných baňkách s 80 ml inokulační půdy. K naočkování druhé vegetativní generace jsme používali první vegetativní generace po příslušné době kultivace, a to vždy 10 ml na baňku. Teplota kultivace byla 25 °C. Doba kultivace byla odvislá od fermentačního postupu. Právě tak jako u první vegetativní generace, používali jsme i druhé vegetativní generace zpravidla bezprostředně po dokončení kultivace.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Při fermentaci na rotační třepačce (240 obr./min., průměr kružnice 5 cm) jsme používali 500 ml varných baněk se 100 ml příslušné produkční půdy. Doba kultivace byla 4 dny při teplotě 25 °C. Produkční půdy jsme očkovali 10 % vegetativního inokula. Vzorky pro stanovení penicilinu jsme odebírali 3. a 4. den fermentace. Většinu fermentací jsme prováděli souběžně na reciproké třepačce (96 kyvů/min. při délce kyvu 10,5 cm). Technika fermentace je obdobná fermentaci na rotační třepačce s těmito výjimkami: baňky jsme plnili 60 ml fermentační půdy, inokulum jsme připravovali na rotační třepačce shodně s inokulem pro rotační třepačku. Fermentace trvala 6 dnů, při čemž vzorky pro stanovení obsahu penicilinu jsme odebírali 4. až 6. den. Mycelium, ulpívající na stěnách baněk, jsme smývali pravidelně každých 24 hodin.

Kmen 49—133 sloužil při zavádění nového fermentačního postupu pro kmen 51—20 v řadě případů jako kontrola. Jako inokulační půdy pro kmen 49—133 jsme používali půdy ST, ze které byla ve stáří inokula 36 hodin očkována produkční půda A I.

*Živná prostředí.* Sporulační půda S: glycerin 6,0 ml, melasa 7,5 ml, kvasniční extrakt Yatex 5,0 g, NaCl 10,0 g, $KH_2PO_4$ 0,06 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ 0,05 g, $Fe_2(SO_4)_3 . (NH_4)_2SO_4 . 24H_2O$ 0,016 g, $CaSO_4 . 2H_2O$ 0,25 g, roztok $CuSO_4 . 5H_2O$ (1 mg/ml) 0,1 ml, agar Difco 25,0 g, destilovaná voda 1000 ml. pH se neupravuje, doba sterilisace je 20 minut při 120 °C.

Inokulační půda ST: kukuřičný extrakt*) (55 % suš.) 36,5 g, glukosa 40,0 g, $CaCO_3$ 2,0 g, směs solí 4,0 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Sterilisace 30 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 5,4 až 5,8. Směs solí: $KH_2PO_4$ 8,75 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ 2,0 g, $ZnSO_4 . 7H_2O$ 0,30 g, $MnSO_4 . 4H_2O$ 0,1 g, $NaNO_3$ 52,5 g.

Inokulační půda Dex: kukuřičný extrakt (55 % suš.) 27,2 g, dextrin 60,0 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Doba sterilisace 30 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 5,4 až 5,8.

Inokulační půda B I: kukuřičný extrakt (55 % suš.) 60,0 g, sacharosa 27,0 g, $Na_2SO_4$ 1,0 g, NaOH 0,4 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Sterilisace 30 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 5,8.

Inokulační půda B II: kukuřičný extrakt (55 % suš.) 31,0 g, sacharosa 20,0 g, $NaNO_3$ 3,0 g, $KH_2PO_4$ 0,4 g, $CaCO_3$ 4,0 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ 0,08 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Sterilisace 30 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 5,8.

Produkční půda A I: kukuřičný extrakt (55 % suš.) 38,0 g, laktosa 25,0 g, $CaCO_3$ 6,6 g, $Na_2SO_4$ 0,4 g, fenylacetamid 0,5 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Sterilisace 20 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 5,8 až 6,2.

Produkční půda B III: kukuřičný extrakt (55 % suš.) 2,0 g, laktosa 38,0 g, arašidová mouka (8 % celkového dusíku) 23,0 g, $CaCO_3$ 5,0 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ 0,09 g, $Na_2SO_4$ 1,4 g, fenylacetamid 0,5 g, vodovodní voda 1000 ml, sojový olej 0,05 ml na baňku. Sterilisace 20 minut při 120 °C, pH po sterilisaci 6,8 až 7,2.

*Stanovení produkce penicilinu.* Obsah penicilinu ve filtrovaných vzorcích jsme stanovili plotnovou difusní metodou při použití testovacího kmene *Bacillus subtilis* PCI-220 (Hess 1955). Produkci jsme hodnotili vždy průměrem maxim, dosažených u každé ze tří baněk v pokusu.

## *Výsledky*

### Stabilita kmene 51—20

Prvním předpokladem pro práci s kmenem 51—20 bylo ověření stability kultury. Kmen jsme vyočkovali z pískové konservy na sporulační půdu S a pasážovali až do páté generace. Všechny sporové generace jsme produkčně zhodnotili fermentačním postupem, vypracovaným pro kmen 49—133. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Kmen 51—20 je velmi stabilní, neboť vlivem pasážování nedošlo téměř k poklesu produkce.

Tab. 1. Stabilita produkce u kmene 51—20 při sporovém pasážování. Fermentace byly provedeny na rotační třepačce. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 4 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 49—133.

| I. generace | | II. generace | | III. generace | | IV. generace | | V. generace | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| j./ml | % | j./ml | % | j./ml | % | j./ml | % | j./ml | % |
| 1372 | 165 | 1400 | 168 | 1580 | 190 | 1461 | 176 | 1286 | 155 |

*) Výrazem kukuřičný extrakt nahrazujeme termín „corn-steep" (zahuštěná máčecí voda odpadající při výrobě kukuřičného škrobu).



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

První, druhá a třetí generace byly konservovány. Po naočkování konserv na sporulační půdu S byly kultury pasážovány až do třetí generace. Všechny tyto kultury jsme produkčně hodnotili optimálním postupem pro kmen 49—133 a nezjistili jsme opět vlivem tohoto pasážování produkční pokles.

Během dvou měsíců skladování sporového inokula na půdě S při teplotě + 5 °C i — 18 °C nedošlo u kmene 51—20 k poklesu produkce. Právě tak jsme zhodnotili produkční stabilitu vegetativního inokula, uchovávaného při teplotě + 5 °C. Zde jsme však zjistili, že vegetativní inokulum je velmi citlivé na dobu skladování. Maximální možná doba jeho přechovávání je 7 dní. Při delším skladování klesá jeho produktivita.

## Způsob přípravy vegetativního inokula

Jako inokulační půdy jsme použili půdy ST a Dex, ze kterých jsme očkovali po 24, 36, 48, 54 a 62 hodinách do produkční půdy A I. Průměrné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 2. Při použití inokulační půdy ST bylo dosaženo vyšší produkce penicilinu než při použití půdy Dex. Optimální stáří inokula na půdě ST je 48 hodin, na půdě Dex 24 hodin. Vzhledem k těmto výsledkům jsme proto v dalších pokusech používali inokulační půdy ST a vegetativního inokula starého 48 hodin.

Tab. 2. Vliv délky kultivace vegetativního inokula na výši produkce při použití inokulačních půd ST a Dex. Fermentace byly provedeny na rotační třepačce. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 4 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 49—133.

| Délka kultivace vegetativního inokula v hodinách | Inokulační půda | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ST | | Dex | |
| | j./ml | % | j./ml | % |
| 24 | 1285 | 139 | 1326 | 143 |
| 36 | 1375 | 149 | 1238 | 133 |
| 48 | 1433 | 155 | 1261 | 136 |
| 54 | 1325 | 143 | 1288 | 139 |
| 62 | 1136 | 122 | 1055 | 114 |

Tab. 3. Vztah mezi produktivitou a množstvím půdy ve fermentační baňce. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 3 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 49—133.

| Množství půdy v baňce v ml | Rotační třepačka | | Reciproká třepačka | |
|---|---|---|---|---|
| | j./ml | % | j./ml | % |
| 40 | 823 | 82 | 973 | 129 |
| 60 | 957 | 95 | 1198 | 159 |
| 80 | 1213 | 121 | 1106 | 146 |
| 100 | 1490 | 148 | 1109 | 147 |
| 120 | 1518 | 151 | 903 | 119 |

## Vliv množství fermentační půdy na výši produkce

Při kultivacích na rotační a reciproké třepačce jsme měnili množství fermentační půdy A I v 500 ml varných baňkách. Sledovaná množství půdy byla 40, 60, 80, 100 a 120 ml. Půdu jsme očkovali 10 % vegetativního inokula ve stáří 48 hodin (inokulační půda ST). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3. Pro fermentaci kmenem



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

51—20 na rotační třepačce je optimální množství půdy 120 ml, na reciproké 60 ml. Na rotační třepačce probíhá křivka produkce antibiotika v závislosti na množství fermentační půdy opačným směrem než na reciproké třepačce. V dalších pokusech jsme užívali na základě těchto výsledků pro reciprokou třepačku 60 ml půdy, pro rotační z technických důvodů pouze 100 ml půdy.

## Vypracování fermentačního postupu pro kmen 51—20

Po zjištění základních charakteristik kmene 51—20 jsme přikročili k vypracování fermentačního postupu. Nejprve jsme vyzkoušeli různé inokulační půdy pro prvou a druhou vegetativní generaci, dále stáří vegetativního inokula a konečně novou produkční půdu B III.

Tab. 4. Vliv délky kultivace vegetativního inokula na výši produkce při dvoustupňové fermentaci. Fermentace byly provedeny na rotační třepačce. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 2 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 51—20 při fermentačním postupu ST (48 hod.) — A I.

| Stáří vegetativního inokula v hodinách | Inokulační půda B I | | Inokulační půda B II | |
|---|---|---|---|---|
| | j./ml | % | j./ml | % |
| 24 | 1045 | 85 | 1071 | 87 |
| 36 | 1355 | 110 | 1227 | 100 |
| 48 | 1259 | 103 | 1084 | 88 |

Tab. 5. Třístupňová fermentace na produkční půdě A I. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 3 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 51—20 při postupu ST (48 hod.) — A I.

| Stáří vegetativního inokula v hodinách | | Rotační třepačka | Reciproká třepačka |
|---|---|---|---|
| půda B I | půda B II | | |
| 24 | 24 | 100 | 97 |
| 36 | 24 | 98 | 107 |
| 48 | 24 | 90 | 116 |
| 24 | 36 | 75 | 97 |
| 36 | 36 | 77 | 105 |
| 48 | 36 | 89 | 102 |
| 24 | 48 | 102 | 105 |
| 36 | 48 | 107 | 118 |
| 48 | 48 | 101 | 108 |

1. Inokulační půdy. Pro fermentaci kmenem 51—20 jsme zhodnotili inokulační půdy B I a B II při použití různě starého vegetativního inokula. Jako produkční půdy jsme používali půdy A I. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Optimální stáří vegetativního inokula, připraveného na půdě B I, je 36 hodin. Tento postup však není podstatně výhodnější než postup dosud používaný, t. j. ST (48 hod.) — A I. Při použití inokulační půdy B II byla optimální doba kultivace inokula opět 36 hodin, avšak ani tímto postupem nebylo dosaženo vyšších produkcí.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

2. Inokulační půdy pro třístupňovou fermentaci. Pro přípravu prvé vegetativní generace jsme použili půdy B I, pro přípravu druhé vegetativní generace půdy B II. U těchto půd jsme hodnotili vliv různého stáří vegetativního inokula na výši produkce při použití produkční půdy A I. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5. Při postupu B I—B II—A I při použití různě staré první a druhé vegetativní generace nebylo dosaženo (posuzováno zejména podle výsledků z rotační třepačky) v zásadě vyšší produkce. Ze zkoušených alternativ byl nejvýhodnější postup, při kterém první vegetativní generace byla kultivována 36 hodin na půdě B I, z této první generace očkována druhá vegetativní generace na půdu B II a z té ve stáří 48 hodin očkována produkční půda.

Tab. 6. Třístupňová fermentace na produkční půdě B III. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 3 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 51—20 při postupu ST (48 hod.) — A I.

| Stáří vegetativního inokula v hodinách | | Rotační třepačka | | Reciproká třepačka | |
|---|---|---|---|---|---|
| půda B I | půda B II | j./ml | % | j./ml | % |
| 48 | 24 | 1313 | 124 | 1002 | 127 |
| 48 | 36 | 1564 | 149 | 1001 | 127 |
| 36 | 48 | 1319 | 125 | 849 | 103 |

3. Produkční půda. Zhodnocené inokulační postupy byly aplikovány pro použití produkční půdy B III. Zhodnotili jsme fermentační postup B I (48 hod.) — B II (24 hod.), B I (48 hod.) — B II (36 hod.), B I (36 hod.) — B II (48 hod.). Výsledné produkce jsou shrnuty v tabulce 6. Nejvyšší produkce bylo dosaženo při postupu B I (48 hod.) — B II (36 hod.), a to na rotační třepačce 1564 j./ml, v procentech kontroly 149 % produkce téhož kmene při dosud užívaném postupu ST (48 hod.) — A I.

Tab. 7. Dvoustupňová fermentace na produkční půdě B III při použití různých inokulačních půd. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze 3 pokusů a jsou vyjádřeny v procentech kontroly kmene 51—20 při postupu ST (48 hod.) — A I. Jednotlivé fermentační postupy nebyly hodnoceny současně a měly vždy samostatnou kontrolu.

| Inokulační půda | Rotační třepačka | | Reciproká třepačka | |
|---|---|---|---|---|
| | j./ml | % | j./ml | % |
| B I | 972 | 84 | 648 | 95 |
| B II | 1278 | 110 | 749 | 110 |
| ST | 1206 | 116 | 1110 | 109 |
| Dex | 1215 | 113 | 904 | 112 |

4. Produkční půda B III v kombinaci s inokulační půdou B I, B II, ST a Dex. Produkční půdu B III jsme očkovali vegetativním inokulem připraveným na půdě B I, B II, ST a Dex. Na půdě B I bylo inokulum kultivováno 36 hodin, na půdě B II 36 hodin, na půdě ST 48 hodin a na půdě Dex 24 hodin. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Uvedené kombinace fermentačního postupu s půdou B III byly proti postupu B I (48 hod.) — B II (36 hod.) — B III produkčně nevýhodné.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Diskuse*

Ze získaných výsledků lze vyvodit některé závěry, které podávají informace o významu jednotlivých faktorů na produkční výši. Lze se domnívat, že tyto závěry mohou mít pro vývoj postupu fermentace penicilinu, případně i jiných antibiotik, obecnější platnost. Tak v průběhu celé práce jsme dosáhli relativně nejvyššího jednorázového zvýšení produkce použitím kmene 51—20 při fermentaci postupem, který byl téměř v nezměněné formě optimální pro předcházející kmen 49—133. Je to zřejmé na př. z tabulek 1 až 3. Z mnohonásobně opakovaných pokusů, kdy kmenem 51—20 bylo fermentováno podle schematu ST (48 hod.) —A I, vyplynula průměrná produkce 1316 j./ml, t. j. 137 % kontroly kmene 49—133 při skoro totožném fermentačním postupu ST (36 hod.) — A I. Při fermentaci trojstupňovým postupem podle schematu B I — B II — B III se zvýšila produkce v průměru z mnohonásobně opakovaných fermentací na 1560 j./ml, t. j. o dalších 19 %. U produktivity uvedeného trojstupňového postupu se uplatňuje jak složení vlastní fermentační půdy, tak dvoustupňový způsob přípravy inokula na sacharosových půdách. Význam složení fermentační půdy potvrzují výsledky, získané při sledování vlivu doby kultivace vegetativního inokula při třístupňovém fermentačním procesu, kde byla vlastní fermentace provedena jednak na půdě A I, jednak na půdě B III. Zatím co na fermentační půdě B III se při sledovaných dobách kultivace inokula na půdách B I a B III pohybovaly produkce na rotační třepačce mezi 124 až 149 % kontroly, činila obdobná čísla, získaná na půdě A I, pouze 89 až 107 % kontroly postupu ST (48 hod.) — A I. Produkční význam dvoustupňové přípravy vegetativního inokula je zřejmý z porovnání výsledků, uvedených v tabulce 7, s průměrnou produktivitou konečného trojstupňového fermentačního postupu.

Při dvoustupňovém fermentačním procesu je produktivita jen málo ovlivňována dobou kultivace vegetativního inokula. Tak na př. při fermentaci na půdě A I činí největší produkční diference při kultivaci inokula na půdě ST v rozpětí 24 až 54 hodin 16 %, na půdě Dex 10 %. Naproti tomu však při třístupňovém fermentačním procesu má doba kultivace prvé a druhé vegetativní generace na půdách B I a B II účinek podstatně pronikavější. Při použití půdy A I pro fermentaci činí maximální zjištěná diference 32 % kontroly na třepačce rotační a 21 % kontroly na třepačce reciproké.

Z posouzení jednotlivých výsledků, dosažených ve stejných pokusech při fermentaci na třepačce rotační a paralelně reciproké, vyplývá, že rozdíly ve způsobu třepání se uplatňují různě za různých podmínek. Důkazy pro toto zjištění jsou zřejmé z jednotlivých tabulek a není třeba se jimi podrobně zabývat. Je zřejmé, že pro studium fermentace v laboratorním měřítku je daleko vhodnější pracovat na třepačce rotační, která v zásadě podmiňuje dosažení vyššího provzdušňování než třepačka reciproká. Vzhledem k tomu, že intensita přenosu kyslíku nemá za různých fermentačních podmínek vždy stejný vliv (J. Vondráčková, osobní sdělení), je nutno počítat s tím, že po převedení laboratorního fermentačního postupu do fermentací tankových nemusí být ve všech bodech fermentačního procesu paralelita mezi výsledky získanými při fermentaci třepačkové a tankové.

V této souvislosti stojí za zmínku, že uvedený trojstupňový fermentační postup po převedení do laboratorních fermentačních tanků (obsah 20 litrů) dával téměř bez odchylek proti laboratornímu předpisu průměrné produkce 2400 j./ml při trvání fermentace 120 až 130 hodin.

*Souhrn*

Při vývoji laboratorního fermentačního postupu pro kmen 51—20 jsme sledovali jednotlivé činitele, ovlivňující dosažitelnou produkční výši. Při pasážování tohoto



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

kmene až do páté sporulační generace na pevné půdě nedochází k poklesu produkce. Sporulační kultury lze skladovat maximálně po dobu dvou měsíců, vegetativní inokulum však maximálně 1 týden. Při fermentaci postupem, který byl dříve vypracován jako optimální pro kmen 49—133, produkuje kmen 51—20 na rotační třepačce v průměru 1316 j./ml. Při tomto postupu je vegetativní inokulum připravováno na glukosové očkovací půdě; fermentační půda je typu laktosa — kukuřičný extrakt. Zavedením nového fermentačního postupu byly produkce zvýšeny v průměru na 1560 j./ml. Tento postup je třístupňový. Vegetativní inokulum je připravováno ve dvou generacích na půdách typu sacharosa — kukuřičný extrakt, fermentační půda je typu laktosa — arašidová mouka — kukuřičný extrakt. V souběžných fermentacích na třepačce rotační a reciproké jsme zjistili, že rozdílná intensita provzdušňování se může uplatňovat různě za různých podmínek fermentace. Poukázali jsme na význam jednotlivých činitelů biologických podmínek fermentace na produkční výši.

Stanovení obsahu penicilinu prováděl J. Hess, fermentace v laboratorních tancích poloprovozní skupina ústavu, vedená Ing. J. Zajíčkem.

## Literatura

Anderson, R. F., Whitemore, L. M., Brown, W. F.: *Penicillin production by pigment-free molds.* Ind. Eng. Chem. 45 : 768, 1953.

Hess, J.: *Mikrobiologické stanovení antibiotik difusní metodou na kovových plotnách.* Sbírka vědeckých prací Min. zdravotnictví 6 : 73, 1955.

Johnson, M. J.: *Recent advances in penicillin fermentation.* Bull. World Hlth Org. 6 : 99, 1952.

Stauffer, J., Backus, M. P.: *Spontaneous and induced variation in selected stocks of the Penicillium chrysogenum series.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 60 : 35, 1954.

Tornqvist, E. G. M., Peterson, W. H.: *Effect of oil on penicillin production by two new strains of Penicillium chrysogenum.* Abstracts of Papers, 126th Meet. Am. Chem. Soc. 16A—17A, 1954.

## Влияние условий ферментации на продукцию пенициллина штаммом Penicillium chrysogenum 51—20

*В. Мателова и Я. Нечасек*

### Резюме

При разработке лабораторных приемов ферментации для штамма 51—20 мы исследовали отдельные факторы, влияющие на размеры достижимой продукции. При пассажах этого штамма вплоть до пятой спорообразующей генерации на плотной среде уменьшение продукции не наблюдалось. Спорообразующие стадии культуры можно хранить максимально в течение 2 месяцев, но вегетативный inoculum — не больше недели. При ферментации по способу, который был нами разработан ранее как оптимальный для штамма 49—133, штамм 51—20 дает на вращающейся качалке в среднем 1316 ед./мл. При этом способе вегетативный inoculum приготовляется на инокуляционной среде с глюкозой; для ферментации используется среда типа лактоза — кукурузный экстракт. Введение нового способа ферментации повысило продукцию в среднем до 1560 ед./мг. Это способ трех ступеней. Вегетативный inoculum приготовляется в двух генерациях на среде типа сахароза — кукурузный экстракт; ферментационная среда бывает типа лактоза — арахидная мука — кукурузный экстракт. При параллельной ферментации на вращающейся и поступательной качалках мы установили, что аэрация различной интенсивности может оказывать различное влияние в зависимости от различных условий ферментации. Мы анализировали значение отдельных факторов биологических условий ферментации для размеров получаемой продукции пенициллина.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

# The Significance of Fermentation Conditions for the Production of Penicillin by the Strain Penicillium chrysogenum 51—20

*V. Matelová and J. Nečásek*

Summary

In developing a laboratory fermentation method for the strain 51—20, a study was made of the individual factors which influenced the attainable production level. By successive transfer of this strain up to the fifth spore generation on a solid medium, no decrease in production occurred. The sporulated cultures can be stored for two months at most, the vegetative inoculum for maximally one week. By a fermentation method which was originally elaborated as being optimal for strain 49—133, the strain 51—20 produces an average of 1316 $\mu$/ml. using a rotary shaker. With this method, the vegetative inoculum is prepared on a glucose inoculation medium and the fermentation medium is of the type of lactose—corn-steep. The introduction of the new fermentation method resulted in an average increase in production of 1560 $\mu$/ml. This method consists of three steps. The vegetative inoculum is prepared in two generations on sucrose—corn-steep media, the fermentation medium is of the type of lactose—peanut flour—corn-steep. In parallel fermentations on a rotary and reciprocating shaker, it was found that different intensity of aeration can have varying effects under different conditions of fermentation. The influence of the individual factors of the biological conditions of fermentation on production is discussed.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Nové antibiotikum BU 306

VLADIMÍR ŠEVČÍK, MILOSLAV PODOJIL, MARTA KYSELOVÁ a ALENA VRTIŠKOVÁ

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

*Došlo 28. 4. 1956*

Z antibiotik bílkovinného charakteru, isolovaných z aktinomycet a účinných na grampositivní i gramnegativní bakterie, byl v literatuře popsán pouze aktinomycetin (Welsch 1937—1947). V následující práci uvádíme vysokomolekulární antibiotikum pravděpodobně bílkovinného charakteru, účinné na grampositivní i gramnegativní bakterie.

## *Materiál a metody*

*Kmen* aktinomycety BU 306 byl isolován z půdního vzorku.

*Selekce* kmene aktinomycety, *laboratorní kultivace* a *mikrobiologické titrace* antibiotika jsme prováděli podobným způsobem jako u antibiotika BU 271 (Ševčík a sp. 1956). Křivka antibiotika BU 306 u difusní metody mikrobiologických titrací odpovídá křivce streptomycinu v rozmezí 1—4 j./ml.

*Příprava surového preparátu antibiotika.* Antibiotikum BU 306 můžeme adsorbovat na aktivní uhlí při kyselé, neutrální i zásadité reakci (pH 2—9), eluce s uhlí okyseleným methanolem ani směsí methanolu a benzenu (1 : 1) však nikdy nebyla úspěšná.

Jelikož nebyla výhodná ani adsorpce na aktivní uhlí ani extrakce organickými rozpouštědly, byly surové preparáty antibiotika připraveny lyofilisací dialysovaných filtrátů šestidenní kultury aktinomycety.

350 ml fermentační tekutiny o pH 7,45 a účinnosti 3.500 j. S./ml (streptomycinových jednotek) jsme zcentrifugovali a čirý roztok 48 hod. dialysovali proti destilované vodě při teplotě + 2 °C. Roztok bez elektrolytů byl lyofilisován, čímž jsme získali 440 mg slabě nažloutlého amorfního prášku s účinností 2 000 streptomycinových jednotek na mg. Reakce amorfního prášku s ninhydrinem byla positivní.

Antibiotikum BU 306 může být vysráženo z filtrátu kultury po přidání 60 % $(NH_4)_2SO_4$.

*Elektroforesa.* K elektroforese antibiotika BU 306 jsme používali papíru zn. Whatman č. 1 (7,5 cm × × 30 cm), a to jednak v 0,05 M octanovém ústoji pH 5,2 (265 V, 5 mA, 3 hod.) a jednak v 0,0125 M fosfátovém ústoji pH 7,2 (265 V, 2,5 mA, 3 hod.). Jako kontroly pro endosmosu jsme použili chloramfenikolu a hydrolysátu želatiny.

*Cytostatickou účinnost* jsme zjišťovali metodou podle Yamamoto a Yamaoko (1954) u myší s Ehrlichovým ascitickým tumorem.

## *Výsledky a diskuse*

Antibiotikum BU 306 jsme získali z kmene aktinomycety, uvedené v naší sbírce pod číslem 306. Kolonie aktinomycety, které jsou vespod rezavě hnědé, tvoří na běžných agarových půdách nažloutlé spory, pigment do agarové půdy neprodukují.

Původní kmen aktinomycety produkoval při submersní kultivaci na třepačce na půdě uvedené u antibiotika BU 271 (Ševčík a sp. 1956) 120 j. S./ml (streptomycinových jednotek). Rozsevem na agarových půdách téhož složení jsme získali odštěpy s maximální produkcí okolo 1000 j. S./ml. Postupným přeočkováváním na šikmých



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

bramborových agarech klesala produkce antibiotika z 1000 j. S./ml až na 300 j. S./ml. Po novém rozsevu na agarové půdě jsme získali 35 odštěpů, z nichž většina (27) produkovala antibiotikum, avšak v menší míře (100—400 j. S./ml). Získané odštěpy byly dost nestálé. Dalším rozsevem isolátu, produkujícího 400 j. S./ml, byly získány 32 odštěpy, z nichž u 7 byla mnohem vyšší produkce (1000—1600 j. S./ml).

Rozsev aktinomycety BU 306 byl prováděn na agarové půdě s kukuřičným extraktem (0,5 %), která svým obsahem aminokyselin může představovat vhodné prostředí pro biosyntesu bílkovin (molekulu antibiotika). Jednotlivé odštěpy jsme uchovávali na šikmých bramborových agarech v lednici při + 4 °C.

Vysokou produkci antibiotika (1500—2000 j. S./ml) jsme získali při kultivaci na reciproké třepačce na výše uvedené půdě s kukuřičným extraktem. V některých případech byla získána maximální produkce 3500 j. S./ml, a to po 6—7 dnech kultivace.

Tabulka 1. Stabilita antibiotika BU 306

| Zcentrifugovaný vzorek | pH 2,0 | pH 7,0 | pH 9,0 |
|---|---|---|---|
| | streptomycinových jednotek v ml | | |
| Po úpravě pH | 140 | 160 | 148 |
| 24 hod. 4 °C | 116 | 160 | 115 |
| 24 hod. 20 °C | 0 | 150 | 53 |
| 15 min. 100 °C | 0 | 0 | 0 |

Při fermentaci ve skleněném laboratorním tanku o obsahu 1000 ml jsme dosáhli maximální produkce 1150 j. S./ml po 120 hod. kultivace. Laboratorní tank jsme očkovali vegetativním inokulem (2 % objemu půdy) z třepačky, starým 24 hod.; míchání 375 ot./min., vzdušnění jeden objem vzduchu za minutu.

Stabilita antibiotika je uvedena v tabulce 1. Při 2 °C bylo antibiotikum stálé po několik týdnů.

Organická rozpouštědla antibiotikum rozrušují. Antibiotikum BU 306 nedialysuje celofánovou membránou; skvrna antibiotika po oddělení od balastních látek na papírovém elektroforegramu se barví bromfenolovou modří, což ukazuje na možnost, že jde pravděpodobně o bílkovinný charakter molekuly.

Antibiotikum BU 306 je při difusní metodě mikrobiologických titrací nejúčinnější při pH 8. Účinnost postupně klesá s klesajícím pH. 50% krevním serem je antibiotikum inaktivováno z jedné poloviny. Antibiotikum BU 306 působí na grampositivní i gramnegativní bakterie. Účinnost antibiotika je uvedena v tabulce 2. Na mikroba *Mycobacterium phlei* působí antibiotikum BU 306 přibližně v těchže koncentracích jako streptomycin.

Antibiotikum BU 306 není příliš toxické. Na protozoa *Tetrahymena gelei* a *Euglena gracilis* nepůsobila koncentrace 1000 j./ml toxicky (filtrát kultury). Toxicita u myší závisela na množství přítomných vysokomolekulárních balastních látek a ne na koncentraci (účinnosti) antibiotika. U intravenosních injekcí bylo $LD_{50}$ 0,5 mg/20 g u lyofilosovaného preparátu po dialyse s účinností 2000 j./ml. U preparátu s účinností 800 j./mg bylo $LD_{50}$ 0,7 mg/20 g, což odpovídá 560 j./myš a u preparátu s účinností 120 j./mg bylo $LD_{50}$ 1 mg/20 g, což odpovídá 120 j./myš.

Antibiotikum BU 306 působilo též na Ehrlichův ascitický tumor u myší. U kontaktního testu, kdy buňky tumoru byly 3 hod. v lednici s antibiotikem, pozorováno přežívání myší u dávek 125 j./myš. Zatím co kontrolní myši s tumorem bez antibiotika hynuly po 12—15 dnech, přežívaly myši s antibiotikem přes měsíc. V pokuse



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

bylo použito preparátu s účinností 1000 j./mg. Podobné výsledky jsme pozorovali u terapeutických testů s touže koncentrací antibiotika, kdy antibiotikum bylo podáváno jednou denně celkem po osm dní. Antibiotikum bylo podáváno intraperitoneálně a prvá dávka antibiotika byla vstříknuta za tři dny po naočkování tumoru.

Tabulka 2. Spektrum účinku antibiotika BU 306

| Mikroorganismus | Inhibice mikroba (j. S./ml) |
|---|---|
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | 1 |
| *B. mesentericus* | 1 |
| *B. mycoides* | 1 |
| *B. tumefaciens* | 1 |
| *Staphylococcus aureus* | 1 |
| *Sarcina lutea* | 0,5 |
| *Micrococcus lysodeicticus* | 0,2 |
| *M. cremori viscosi* | 8 |
| *Escherichia coli* | 16 |
| *E. freundi* | 16 |
| *Salmonella typhosa* | 1 |
| *S. puratyphi* B | 1 |
| *S. typhi murium* | 1 |
| *Shigella paradysenteriae* | 0,5 |
| *Sh. alcalescens* | 0,5 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 4 |
| *P. putida* | 1 |
| *Nocardia asteroides* | 0,5 |

Z vysokomolekulárních antibiotik (bílkovinného charakteru), která působí na grampositivní i gramnegativní bakterie, je znám u aktinomycet pouze aktinomycetin. Antibiotikum BU 306 se však liší od aktinomycetinu jednak stabilitou a jednak způsobem isolace. Antibiotikum BU 306 se nevysráží ani okyselením na pH 3—4 pomocí HCl, ani přidáním 4 objemů alkoholu nebo acetonu.

## *Souhrn*

Antibiotikum BU 306 bylo získáno z blíže neurčené aktinomycety označené čís. 306. Surový preparát antibiotika je nažloutlá vysokomolekulární látka, která se barví na elektroforegramu bromfenolovou modří. Antibiotikum působí na grampositivní i gramnegativní bakterie a na Ehrlichův ascitický tumor u myší.

Toxicita antibiotika závisí na čistotě preparátu. U preparátu s účinností 2000 j. S./mg bylo $LD_{50}$ při intravenosních injekcích 25 mg/kg.

Antibakterijním spektrem a velikostí molekuly se podobá antibiotikum aktinomycetinu, od něhož se však liší stabilitou, způsobem isolace a rozpustností v organických rozpouštědlech.

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



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9


Literatura

Ševčík, V.: *Úvod do biochemické analysy mikroorganismů.* Praha 1954.
Ševčík, V.: *Nové antibiotikum BU 271.* Čs. mikrobiologie, 1 : 223, 1956
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.
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 microbiennes.* 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, 1939 b.
Welsch, M.: *Bacterial substances from sterile culture-media and bacterial cultures; with special reference to the bacteriolytic properties of Actinomycetes.* J. Bact., 42 : 801, 1941.
Welsch, M.: *Actinomycetin.* J. Bact., 53 : 101, 1947.
Welsch, M.: *Phénomènes d'antibiose chez les Actinomycètes.* Gembloux 1947.
Yamamoto, T., Yamaoka, T.: *A study on the screening method of antitumor substances produced by microorganisms.* J. Antib., 7A : 7, 1954.


## Новый антибиотик BU 306

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


Резюме

Антибиотик BU 306 был получен из точнее не определенного лучистого грибка, обозначенного нами № 306. В сыром виде препарат антибиотика представляет желтоватое нейтральное вещество, вероятно белкового характера. Антибиотик действует на грам-положительные и грам-отрицательные бактерии и на асцитную опухоль Эрлиха у мышей. Токсичность антибиотика зависит от степени чистоты препарата. У препарата с эффективностью 2000 ед. с./мг при внутривенных впрыскиваниях $LD_{50}$ была 25 мг/кг. По своему антибактерийному спектру и по размерам молекулы антибиотик близок к актиномицетину, от которого отличается однако по своей устойчивости, по способу изоляции и по растворимости в органических растворителях.


## The New Antibiotic BU 306

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


Summary

The antibiotic BU 306 was obtained from a unidentified actinomyces which was labelled No. 306. The raw preparation of the antibiotic is a yellowish, neutral substance, probably of a protein character. The antibiotic acts on gram-positive and on gram-negative bacteria and also on Ehrlich ascitic tumour in mice. The toxicity of the antibiotic depends on the purity of the preparation. In a preparation with a strength of 2,000 units S/mg., $LD_{50}$ on intravenous administration was 25 mg/kg. The antibacterial spectrum and size of the molecule resemble those of actinomycetin but the antibiotic differs from this by its stability, the method of isolation and solubility in organic solvents.




Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Použití tečkovací reakce na sirovodík při sledování síranové redukce

JIŘÍ ÚLEHLA, MILOŠ SPURNÝ a MILAN DOSTÁLEK

Ústav pro naftový výzkum, Brno

*Došlo 27. 2. 1956*

Proces biologické redukce síranů v přírodních vodách je vázán na činnost desulfurikačních bakterií. Tento pochod, charakteristický pro vody naftových oblastí (Bastin 1926, Šturm 1950), je spojen s obohacením těchto vod sirovodíkem.

Běžně lze usuzovat na intensitu biologické redukce síranů z množství sirovodíku, stanoveného ve vodách analytickými metodami titračními nebo kolorimetrickými. Spolehlivější obraz však získáme sledováním aktivity desulfurikačních bakterií, neboť positivní testy na redukci síranů svědčí o pravděpodobné účasti biologických pochodů na tvorbě sirovodíku ve zkoumaných vodách.

Metodika kvalitativního testování vod na přítomnost desulfurikačních bakterií spočívá v tom, že se analysovaná voda obohatí některými živinami a solemi dvojmocného železa (Starkey 1948). Po inkubaci za anaerobních podmínek se projeví přítomnost desulfurikačních bakterií tvorbou černé sraženiny sirníku železnatého. Podle rychlosti produkce černé sraženiny a podle doby, po níž počíná její tvorba, lze usuzovat na množství a aktivitu desulfurikačních bakterií v studované vodě. Výsledky získané touto metodou mají jen orientační význam. Kvantitativní údaje o výskytu desulfurikačních bakterií prakticky nelze získat ani plotnovou analysou.

Vypracovali jsme proto metodu pro kvantitativní hodnocení biologické redukce síranů ve vzorcích vod, jejíž princip spočívá ve sledování produkce sirovodíku v závislosti na čase, za podmínek optimálních pro rozvoj desulfurikačních bakterií.

## *Materiál a metody*

*Kultury a metody kultivace.* Základní kulturu bakterií todu *Desulfovibrio* jsme získali ze sirovodíkového pramene Dudíkových lázní ve Vizovicích. V pokusech jsme pracovali s hrubě přečištěnou kulturou. Metodika kultivace, charakteristiky růstu, optima pH a rH těchto bakterií byla detailně studována a popsána (Dostálek 1956). Pro kultivaci jsme použili modifikovaného laktátového živného roztoku (Starkey 1948) bez Mohrovy soli: kyselý fosforečnan draselný 0,1 %, chlorid amoný 0,1, chlorid vápenatý 0,01, kryst. chlorid hořečnatý 0,01, síran sodný 0,1, siřičitan sodný 0,02, mléčnan amonný 0,35, kvasničný extrakt 0,005. Při rozborech vod byly živiny rozpouštěny přímo v analysované vodě. Živiny jsme přidali v době, označené za počátek pokusu. Anaerobní kultivaci jsme prováděli v lékovkách se zabroušeným hrdlem o obsahu 100 ml. Kultivační teplota byla udržována při 32 °C.

*Stanovení sirovodíku.* Při všech dynamických metodách, při nichž usuzujeme na základě intensity dalšího růstu na počet mikroorganismů, původně přítomných ve vzorku, je třeba počítat se značnou variabilitou. Podobně je tomu i při sledování síranové redukce. Tato okolnost rozhodovala při volbě chemické metody, která musela být dostatečně rychlá a jednoduchá, aby umožnila sledovat produkci sirovodíku v potřebném počtu paralelních pokusů. Protože redukce síranů vzorkem byla hodnocena na základě několika bodů, t. j. z průběhu křivky produkce sirovodíku v závislosti na čase, nebyla vyžadována od jednotlivého stanovení maximální přesnost.

Uvedeným podmínkám nejlépe vyhovovala běžná tečkovací reakce sirovodíku na filtračním papíře, impregnovaném octanem olovnatým, při níž se tvoří výrazná, černohnědá sraženina sirníku olovnatého. Pro tečkovací reakci jsme použili rolového filtračního papíru n. p. Dřevona Hronov. Archy o rozměrech 22 × 30 cm byly ponořeny do čerstvě připraveného, nasyceného roztoku octanu olovnatého a vysušeny (při použití starších, zásobních roztoků vznikají se sirovodíkem skvrny nestejnoměrně zbarvené,



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

což ztěžuje jejich hodnocení). Zkoumaný vzorek jsme nakapávali mikropipetou vždy v konstantním množství 0,02 ml. Koncentraci sirovodíku ve vzorcích jsme stanovovali visuálním srovnáním se škálou standardů obsahujících 10 až 170 μg $H_2S$/ml. Standardy jsme připravili nakapáváním různě ředěné kultury desulfurikačních bakterií v živném prostředí bez siřičitanů. Obsah sirovodíku v jednotlivých ředěních jsme stanovili přímou jodometrickou titrací. Abychom nemuseli připravovat vždy nové standardy — skvrny sirníku olovnatého časem poněkud zesvětlají — připravili jsme podle standardů permanentní barevnou škálu, podle níž jsme hodnotili všechny skvrny.

## *Výsledky*

Tabulka 1, která zahrnuje hodnocení 34 skvrn, získaných při sledování biologické redukce síranů ve dvou zkoumaných vodách, ukazuje reprodukovatelnost hodnocení sirovodíkových skvrn. Výsledky hodnocení skvrn dvěma pracovníky se lišily v průměru o 8,7 %.

Tab. 1. Reprodukovatelnost hodnocení sirovodíkových skvrn.

| Č. | A | B | \| A – B \| |
|---|---|---|---|
| 1 | 23 | 17 | 6 |
| 2 | 24 | 24 | 0 |
| 3 | 24 | 24 | 0 |
| 4 | 24 | 24 | 0 |
| 5 | 24 | 26 | 2 |
| 6 | 29 | 31 | 2 |
| 7 | 32 | 31 | 1 |
| 8 | 32 | 24 | 8 |
| 9 | 33 | 37 | 4 |
| 10 | 33 | 34 | 1 |
| 11 | 35 | 35 | 0 |
| 12 | 35 | 34 | 1 |
| 13 | 36 | 36 | 1 |
| 14 | 35 | 31 | 5 |
| 15 | 37 | 34 | 3 |
| 16 | 37 | 37 | 0 |
| 17 | 37 | 37 | 0 |
| 18 | 38 | 37 | 1 |
| 19 | 42 | 43 | 1 |
| 20 | 42 | 42 | 0 |
| 21 | 53 | 56 | 3 |
| 22 | 53 | 50 | 3 |
| 23 | 58 | 58 | 0 |
| 24 | 58 | 63 | 5 |
| 25 | 59 | 55 | 4 |
| 26 | 66 | 76 | 10 |
| 27 | 80 | 59 | 21 |
| 28 | 82 | 88 | 6 |
| 29 | 112 | 117 | 5 |
| 30 | 117 | 111 | 6 |
| 31 | 140 | 146 | 6 |
| 32 | 146 | 152 | 6 |
| 33 | 146 | 134 | 12 |
| 34 | 158 | 140 | 18 |
| Součet | 1980 | 1943 | 141 |

Sloupce A a B obsahují průměry třikrát opakovaného visuálního hodnocení týchž skvrn dvěma pracovníky. Skvrny získány nakapáváním kultur desulfurikačních bakterií z přírodních vod. Hodnoty v tabulce udávají μg $H_2S$/ml



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

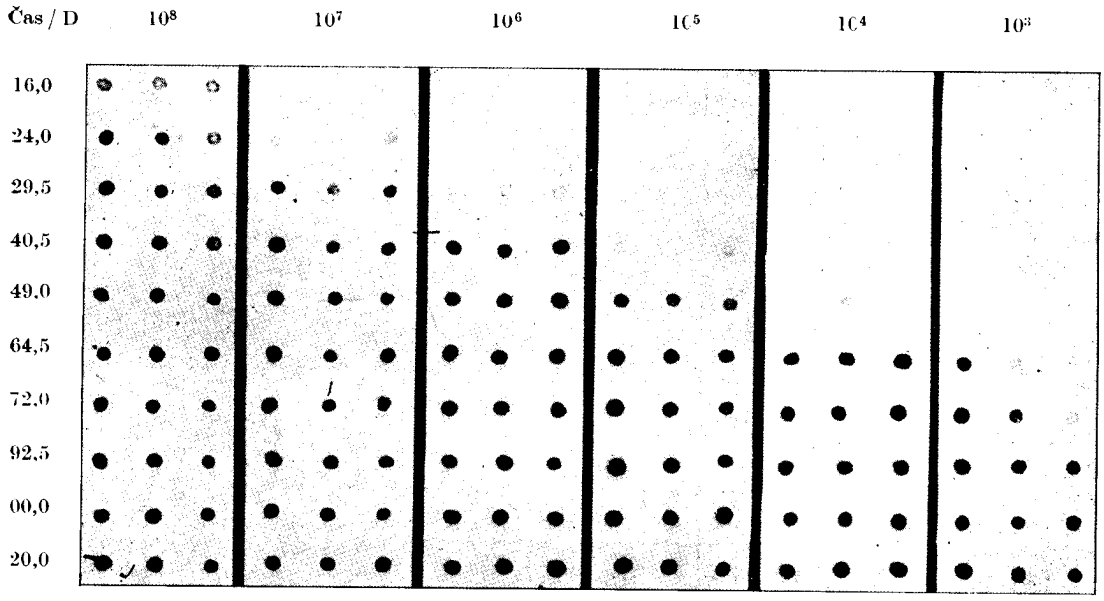
Popsanou metodou jsme sledovali produkci sirovodíku v přečištěných kulturách desulfurikačních bakterií při různě velkém inokulu. Tři dny stará kultura byla po odstředění doplněna do původního objemu živným roztokem a z ní byla připravena zřeďovací řada. Produkci sirovodíku v závislosti na čase a velikosti inokula ukazuje tabulka 1 a obr. 1.

Tab. 2. Hodnoceni produkce sirovodíku v kulturách desulfurikačních bakterií při různě velkém inokulu (viz obr. 1). D = řádový počet desulfurikačních bakterií v 1 ml. - Hodnoty v tabulce udávají $\mu gH_2S/ml$

| Čas \ D | $10^8$ | $10^7$ | $10^6$ | $10^5$ | $10^4$ | $10^3$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 16,0 | 45 | — | — | — | — | — |
| 24,0 | 65 | 25 | — | — | — | — |
| 29,5 | 100 | 65 | 15 | — | — | — |
| 40,5 | 170 | 115 | 80 | 15 | — | — |
| 49,0 | > 170 | 170 | 135 | 80 | 20 | 5 |
| 64,5 | — | — | > 170 | 150 | 115 | 70 |
| 72,0 | — | — | — | > 170 | 150 | 115 |
| 92,5 | — | — | — | — | > 170 | 170 |
| 100,0 | — | — | — | — | — | > 170 |

## *Diskuse*

Na obr. 1 je zřejmá závislost mezi řádem zředění inokula a časem, po němž dochází k produkci sirovodíku. Při aplikaci této metody je třeba dbát na okolnost, že intensita síranové redukce nemusí záviset pouze na počtu a na „aktivitě" desulfurikačních




Obr. 1. Původní záznam produkce sirovodíku v kulturách desulfurikačních bakterií při různě velkém inokulu. D = řádový počet desulfurikačních bakterií v 1 ml.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

bakterií ve vzorku, ale i na ostatních složkách mikrobní populace, jejichž přítomnost se může projevit buďto stimulací (Stárka 1951), nebo i inhibicí (Spurný, Dostálek a Úlehla 1956) produkce sirovodíku. Popsaná metoda je výhodná svou pružností, protože dává beze změny postupu kvantitativní informace o produkci sirovodíku i pro inokula, lišící se velikostí o šest řádů.

Tato výhoda vynikne zejména při porovnání s plotnovými metodami, jejichž použití je pro stanovení desulfurikačních bakterií samo o sobě problematické (Grossman a Postsgate 1953). Plotnové metody dovolují stanovit přesně počet mikroorganismů jedině při takovém zředění vzorku, kdy na jednotku povrchu připadá určitý, úzce vymezený počet zárodků. Tuto podmínku je možno dodržet, jestliže známe alespoň řádově počet mikroorganismů ve vzorku, jinak je třeba předběžně jej stanovit nebo připravit celou serii ploten pro různá ředění. Obojí je velmi nevýhodné při stanovení desulfurikačních bakterií v přírodních vodách, kde se jejich počet může pohybovat mezi $10^1$ až $10^6$ v 1 ml (Spurný, Dostálek a Úlehla 1956).

Věnovali jsme proto samostatnou práci použití popsané metody pro sledování biologické redukce síranů k přímému stanovení počtu desulfurikačních bakterií ve vodách minerálních pramenů. (Spurný, Dostálek a Úlehla 1956).

## *Souhrn*

1. Při studiu biologické redukce síranů jsme sledovali produkci sirovodíku tečkovací reakcí na filtračním papíře nasyceném octanem olovnatým.

2. Tečkovací metodou se stanoví sirovodík v mezích 10 až 170 $\mu$g $H_2S$/ml. Hodnocení skvrn dvěma pracovníky se lišila v průměru o 8,7 %.

3. Poukazujeme na možnost využití popsané metody pro stanovení počtu desulfurikačních bakterií v minerálních vodách.

## Literatura

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

Dostálek, M., Spurný, M.: *Kultivační charakteristiky desulfurikačních bakterií z naftových ložisek.* Čs. mikrobiol. 1 : 158, 1956.

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

Spurný, M., Dostálek, M., Úlehla, J.: *Metoda kvantitativního stanovení desulfurikačních bakterií.* Čs. mikrobiol. 1 : 272, 1956.

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

Starkey, R. L.: *Characteristics and cultivation of sulphate reducing bacteria.* Am. Water Works Assoc. 40 : 1921, 1948.

Šturm, L. D.: *Materialy po mikrobiologičeskomu issledovaniju neftjanych mestoroždenij Vtorogo Baku.* Trudy In-ta nefti 1 : 97, 1950.

## Применение точечной реакции на сероводород при исследовании биологического восстановления сульфатов

*Ю. Улегла, М. Спурный и М. Досталек*

### Резюме

Изучая биологическое восстановление сульфатов, авторы исследовали выделение сероводорода с помощью точечной реакции на фильтровальной бумаге, пропитанной ацетатом свинца. С помощью такого капельного метода определение сероводорода возможно в пределах от 10 до 170 $\mu$г $H_2S$/мл. Результаты оценки отдельных пятен двумя исследователями, работавшими независимо друг от друга, расходились в среднем на 8,7%. Отмечается возможность использовать этот метод для определния количества десульфурирующих бактерий в минеральных водах.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

# Biological Sulphate Reduction as Studied by means of the Spot Test Reaction for Hydrogen Sulphide

*J. Úlehla, M. Spurný and M. Dostálek*

S u m m a r y

The biological reduction of sulphate was studied by means of the spot test reaction for hydrogen sulphide on filter paper impregnated with lead acetate. With the method described, hydrogen sulphide can be estimated in a range of 10 – 170 g/ml. The evaluation of spots by two workers differed on an average by 8.7 %. Attention is drawn to the possible application of this method to the estimation of the number of sulphate reducing bacteria in mineral waters.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# Metoda kvantitativního stanovení desulfurikačních bakterií

MILOŠ SPURNÝ, MILAN DOSTÁLEK a JIŘÍ ÚLEHLA

Ústav pro naftový výzkum, biochemické oddělení, Brno

*Došlo 3. 3. 1956*

Výskyt sirovodíku v hlubinných vodách naftonadějných oblastí není dosud zcela vyjasněným problémem. Vedle názoru, který předpokládá jeho anorganický původ (Gartner 1929, Mahel 1952), jsou teoretické i experimentální podklady pro domněnku, že tvorba sirovodíku ve vodách těchto oblastí je vázána na biologickou redukci síranů činností desulfurikačních bakterií.

Tato skupina byla nalezena prakticky vždy ve vodách naftových oblastí (Gahl a Anderson 1928, Ginzburg-Karagičeva 1933, Isačenko 1940, Šturm 1950, Ekzercev a Kuzněcov 1954) a v sirovodíkových vodách naftonadějných oblastí (Spurný a Dostálek 1956). Výsledky mikrobiologických testů na přítomnost aktivních bakterií této skupiny v minerálních sirovodíkových pramenech mohou poskytnout závažný materiál pro rozhodnutí, zda při nálezech sirovodíku ve vodách je oprávněnější výklad jeho vzniku biologickou redukcí síranů či zda jde o proces anorganický. Po doplnění kvalitativních testů kvantitativními údaji o počtu desulfurikačních bakterií ve studovaných vodách bylo by možno srovnat nalezené počty zárodků s analytickými daty obsahu sirovodíku a tak soudit na zákonitosti mezi aktivitou desulfurikačních bakterií a koncentrací sirovodíku ve vodách.

V této práci navrhujeme metodu kvantitativního stanovení desulfurikačních bakterií ve vodách, jejíž princip spočívá ve srovnání křivek produkce sirovodíku ve studovaných vodách se standardními křivkami, získanými z čistých kultur desulfurikačních bakterií o známém počtu zárodků v 1 ml. Teoreticky jsme předpokládali, že získané křivky budou stejného charakteru a že srovnání se standardy umožní přímo určit množství zárodků této skupiny bakterií.

## *Materiál a metody*

Kvalitativní testování vod na přítomnost desulfurikačních bakterií je popsáno v práci Dostálek a Spurný (1956), kde je rovněž uvedena příslušná literatura. Kvantitativní údaje o četnosti zárodků ve vodách lze získat metodou deskové analysy, což je cesta pracná a je spojena s obtížemi při anaerobní kultivaci bakterií této skupiny na deskách (Grossman a Postgate 1953). Nelze ani prakticky použít metody na stanovení počtu zárodků z hodnot měření zákalu bakterijních kultur nefelometricky, neboť ruší zákal průvodní mikroflory.

*Metody kultivace.* Metodika kultivace, složení živné půdy, růstové charakteristiky, optima pH a rH kultur bakterií rodu *Desulfovibrio* jsou podrobně popsány v práci Dostálka a Spurného (1956). V pokusech jsme užili živného roztoku s laktátem amonným bez Mohrovy soli a 100 ml lékovek se zabroušeným hrdlem ke kultivaci v anaerobních podmínkách. Kultivační teplota byla udržována konstatní 32 °C.

*Stanovení standardních křivek.* Pro stanovení standardních křivek produkce sirovodíku byl pokus uspořádán tak, že základní kultura bakterií rodu *Desulfovibrio* byla očkována ve zřeďovací řadě 1 : 10, 1 : 1.000, 1 : 10.000, 1 : 100.000, 1 : 1,000.000 vždy ve třech paralelních seriích. Základní kulturu pro zřeďovací řadu jsme získali z nahromaďovací kultury bakterií rodu *Desulfovibrio* ze sirovodíkového pramene Dudíkových lázní ve Vizovicích. Protože bylo obtížné získat tyto bakterie v čistých kulturách, spokojili jsme se s přečištěnou kulturou. K pokusu jsme použili tři dny staré kultury v logaritmické fázi růstu (Dostálek a Spurný 1956), centrifugované 15 min. při 18.000 obr/min; bakterijní suspensi jsme



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

doplnili do původního objemu živným roztokem a z ní připravili zřeďovací řadu. Ze základní bakterijní suspense byl současně připraven roztěrový preparát a mikroskopicky stanoven počet zárodků v 1 ml kultury; tak byl znám počet zárodků základní bakterijní kultury a výpočtem byly zjištěny počty v kulturách zřeďovací řady. Růst kultur jsme sledovali v závislosti na produkci sirovodíku; jak ukázaly výsledky pokusů, uvedené ve shora citované práci, je produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií dobrým kriteriem množení bakterií. Produkce sirovodíku v kulturách byla sledována tečkovací reakcí na papíře, syceném octanem olovnatým; metodika stanovení je popsána v práci Úlehla, Spurný a Dostálek (1956). Postupovali jsme tak, že jsme během kultivace odebírali z kultur sterilní mikropipetou vzorky o objemu 0,02 ml a nakapávali je na octanový papír. Skvrny jsme hodnotili srovnáním se standardní škálou, získanou nakapáním roztoku sirníku sodného s odstupňovanou koncentrací, ověřenou jodometrickou titrací. Zjištěných hodnot jsme použili k sestrojení křivek produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií ze zřeďovacího pokusu.

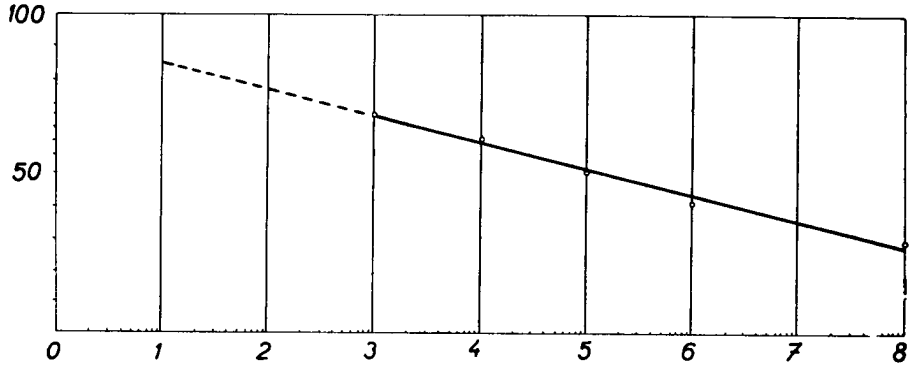
## *Výsledky*

Výsledky ukázaly (tab. 1), že křivky produkce sirovodíku představují typ křivek množení bakterií ve stacionárních kulturách; jsou charakterisovány fází zdržení

Tab. 1. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií v závislosti na počtu očkovaných zárodků. Základní kultura obsahovala 1,26 . $10^9$ zárodků. Hodnoty v tabulce udávají mg $H_2S$/l.

| Kultivace v hod. | Ředění základní kultury desulfurikačních bakterií | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 : 10 | 1 : 1 000 | 1 : 10 000 | 1 : 100 000 | 1 : 1 000 000 |
| 16,5 | 45 | — | — | — | — |
| 24,0 | 65 | — | — | — | — |
| 29,5 | 100 | 15 | — | — | — |
| 40,5 | 170 | 80 | 15 | — | — |
| 49,0 | > 170 | 135 | 80 | 20 | 5 |
| 64,5 | | > 170 | 150 | 120 | 70 |
| 72,0 | | | > 170 | 150 | 120 |
| 92,5 | | | | > 170 | 170 |
| 100,0 | | | | | > 170 |

(lag fází), logaritmickou (růstovou) a stacionární fází. V našem případě, protože horní mez rozlišení skvrn je dána intensitou, odpovídající koncentraci 170 mg $H_2S$/l, byl mnohdy zachycen jen začátek stacionární fáze. Ředění základní bakterijní




Obr. 1. Závislost délky kultivace, potřebné pro standardní produkci sirovodíku (100 mg/l), na počtu desulfurikačních bakterií v kultuře. Osa $x$: log počtu D, osa $y$: kultivační doby v hod., odpovídající produkci 100 mg $H_2S$/l, extrapolované z hodnot tabulky 1.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

suspense o koncentraci $10^8$ zárodků desulfurikačních bakterií v 1 ml se projevilo prodloužením fáze zdržení, kdežto rychlost množení bakterií v logaritmické fázi, vyjádřená směrnicí křivky v této fázi růstu kultur, se lišila jen málo. Hodnota směrnice je dána produkcí sirovodíku za časovou jednotku; prakticky jsme vzali pro výpočet úsek logaritmické fáze pro produkci sirovodíku od 65 do 135 mg/l, nanesený na ose $y$, a délku logaritmické fáze v hodinách kultivace pro tuto produkci, nanesenou na ose $x$. Příslušné hodnoty na obou osách byly čteny z grafu, sestrojeného v měřítku 1 hod. = 1,5 mg $H_2S$/l.

Tab. 2. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií, infikovanými v poměru D : I = 10 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I v 1 ml očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $1{,}14 \cdot 10^8$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^7$ I | $1{,}14 \cdot 10^6$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^5$ I | $1{,}14 \cdot 10^5$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^4$ I | $1{,}14 \cdot 10^4$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^3$ I | $1{,}14 \cdot 10^3$ D<br>$1{,}2 \cdot 10_2$ I |
| 16,5 | 45 | — | — | — | — |
| 24,0 | 65 | — | — | — | — |
| 29,5 | 100 | 15 | — | — | — |
| 40,5 | 170 | 80 | 15 | — | — |
| 49,0 | > 170 | 135 | 80 | 20 | 5 |
| 64,5 | | > 170 | 150 | 115 | 70 |
| 72,0 | | | > 170 | 150 | 115 |
| 92,5 | | | | > 170 | 170 |
| 100,0 | | | | | > 170 |

Tab. 3. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií, infikovanými v poměru D : I = 8 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I v ml očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $8{,}6 \cdot 10^7$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^7$ I | $8.6 \cdot 10^6$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^6$ I | $8{,}6 \cdot 10^5$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^5$ I | $8{,}6 \cdot 10^4$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^4$ I | $8{,}6 \cdot 10^3$ D<br>$1{,}2 \cdot 10^3$ I |
| 23,0 | 10 | — | — | — | — |
| 31,5 | 65 | 5 | — | — | — |
| 47,0 | 170 | 65 | 10 | — | — |
| 55,0 | > 170 | 135 | 30 | 10 | — |
| 72,0 | | > 170 | 130 | 65 | 20 |
| 119,0 | | | > 170 | > 170 | 170 |

Výsledky tohoto pokusu naznačovaly, že křivky produkce sirovodíku v různě ředěných kulturách budou ve své logaritmické fázi prakticky shodné a že počet zárodků desulfurikačních bakterií bude nepřímo úměrný délce fáze zdržení. Za tohoto předpokladu by stačilo stanovit graficky závislost délky lag fáze na počtu desulfurikačních bakterií v kulturách extrapolací pro standardní produkci sirovodíku. Vyhodnocovací graf, sestrojený pro produkci 100 mg $H_2S$/l, je uveden na obr. 1. Tak jednoduchá závislost by platila za předpokladu, že směrnice křivek produkce sirovodíku v kulturách desulfurikačních bakterií by byly v jejich logaritmické fázi shodné.

Při opakování zřeďovacího pokusu jsme zjistili, že hodnoty směrnic křivek v logaritmické fázi se mění v závislosti na ředění kultur; hodnoty směrnic v kulturách s nejvyšším počtem zárodků se blížily hodnotám směrnic, získaných v předcházejícím pokuse, ale s postupným ředěním kultur hodnoty směrnic klesaly. Bylo tedy zřejmé,



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Tab. 4. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií, infikovanými v poměru D : I = 4,7 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I v ml očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | |
|---|---|---|---|
| | $6{,}3 \cdot 10^6$ D<br>$1{,}3 \cdot 10^6$ I | $6{,}3 \cdot 10^5$ D<br>$1{,}3 \cdot 10^5$ I | $6{,}3 \cdot 10^4$ D<br>$1{,}3 \cdot 10^4$ I |
| 17,0 | — | — | — |
| 23,0 | 10 | — | — |
| 41,0 | 25 | 10 | 5 |
| 47,0 | 45 | 20 | 10 |
| 65,0 | 135 | 60 | 30 |
| 71,0 | 170 | 70 | 40 |
| 89,0 | > 170 | 135 | 65 |
| 94,0 | — | 150 | 80 |
| 137,0 | — | > 170 | > 170 |

Tab. 5. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií infikovanými v poměru D : I = 3,4 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I v 1 ml očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | |
|---|---|---|---|
| | $7{,}3 \cdot 10^4$ D<br>$2{,}1 \cdot 10^4$ I | $7{,}3 \cdot 10^3$ D<br>$2{,}1 \cdot 10^3$ I | $7{,}3 \cdot 10^2$ D<br>$2{,}1 \cdot 10^2$ I |
| 23,5 | — | — | — |
| 30,5 | — | — | — |
| 46,0 | 30 | — | — |
| 71,0 | 50 | 30 | 20 |
| 76,0 | 60 | 40 | 25 |
| 118,0 | 115 | 85 | 70 |
| 142,0 | < 170 | 115 | 100 |
| 166,0 | > 170 | 135 | 115 |

Tab. 6. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií, infikovanými v poměru D : I = 2,3 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I v 1 ml očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | |
|---|---|---|---|
| | $7{,}3 \cdot 10^5$ D<br>$3{,}2 \cdot 10^5$ I | $7{,}3 \cdot 10^4$ D<br>$3{,}2 \cdot 10^4$ I | $7{,}3 \cdot 10^3$ D<br>$3{,}2 \cdot 10^3$ I |
| 23,5 | — | — | — |
| 30,5 | 10 | — | — |
| 46,0 | 30 | 15 | — |
| 71.0 | 55 | 40 | 10 |
| 76,0 | 65 | 45 | 25 |
| 118,0 | 125 | 80 | 50 |
| 142,0 | 150 | 115 | 80 |
| 166,0 | 170 | 135 | 115 |



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

že růst desulfurikačních bakterií byl v kultuře brzděn faktorem, který se uplatňoval teprve v logaritmické fázi jejich růstu. Při vyšetřování tohoto faktoru jsme zjistili, že kultury, v nichž byl růst brzděn, jeví silnější zákal proti těm, kde produkce sirovodíku probíhala standardně. V dalších pokusech se ukázalo, že tento zjev úzce souvisí s problémem čistoty kultur, použitých k pokusům.

Získání čistých kultur bakterií rodu *Desulfovibrio* je velmi obtížné, jak vyplývá z údajů literatury (Kupzis 1928, Rubenčik 1947, Stárka 1951). Za stálé kontaminanty se považují především blíže neurčené kokovité bakterie (Rubenčik 1947) a krátké sporulující tyčky gramnegativní, určené jako kmen *Bacillus subtilis* (Stárka 1951). Při podrobném mikroskopickém studiu roztěrových preparátů, pořízených z přečištěných kultur kmene *Desulfovibrio*, v pokuse užitého, byla zjištěna přítomnost obou shora zmíněných kontaminantů. Tyto organismy se vyvíjely na masopeptonovém agaru i na agarované půdě pro pěstování desulfurikačních bakterií jak v aerobních, tak anaerobních podmínkách kultivace.

Na mikroskopických preparátech, pořízených z různě infikovaných kultur desulfurikačních bakterií, jsme určovali vedle desulfurikačních bakterií (D) množství kontaminantů (I) a vyhodnocovali jejich poměr v kulturách (D : I), v nichž jsme stanovovali produkci sirovodíku v závislosti na jejich ředění. S tohoto hlediska byly znovu hodnoceny výsledky pokusu, uvedeného v tabulce 1. Souborné výsledky pokusných serií jsou uvedeny v tabulkách 2—7.

Tab. 7. Produkce sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií, infikovanými v poměru D : I = 1,2 : 1. Hodnoty v tabulce udávají produkci sirovodíku v mg/l

| Kultivace v hod. | Počet D a I očkovaných kultur, stanovený mikroskopicky | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $2 . 10^7$ D<br>$1,7 . 10^7$ I | $2 . 10^6$ D<br>$1,7 . 10^6$ I | $2 . 10^4$ D<br>$1,7 . 10^4$ I | $2 . 10^2$ D<br>$1,7 . 10^2$ I |
| 20,0 | 5 | — | — | — |
| 44,0 | 10 | — | — | — |
| 92,5 | 40 | 25 | 15 | — |
| 116,0 | 80 | 40 | 30 | 25 |
| 164,0 | 115 | — | 70 | 40 |
| 188,5 | 150 | 135 | 100 | 65 |
| 212,5 | 170 | 150 | 135 | 65 |

Z výsledků vyplývá, že produkce sirovodíku v logaritmické fázi růstu je závislá jak na absolutním množství D a I, tak i na jejich poměru v kultuře, a to tak, že absolutní množství D určuje délku lag fáze a poměr D : I určuje hodnotu směrnice logaritmické fáze produkčních křivek sirovodíku (obr. 2). Hodnoty, získané z těchto pokusů, byly sestaveny do nomogramu (obr. 3), z něhož lze po dosazení hodnot pro I a hodnot směrnic zjistit počet desulfurikačních bakterií v 1 ml (a tím i poměr D : I v kultuře) a dobu potřebnou pro produkci 100 mg $H_2S$/l. Pro sestavení tohoto nomogramu jsme zhotovili pomocný graf, kde jsme vyhodnotili závislost hodnot směrnic na době kultivace pro standardní produkci sirovodíku (100 mg $H_2S$/l) při daných koncentracích bakterií v kulturách (obr. 4).

## *Diskuse*

Vztahy mezi jednotlivými veličinami vyhodnocovacího nomogramu a samo jeho použití pro stanovení počtu D platí za těchto předpokladů:

1. Rychlost množení zárodků a tím i rychlost produkce sirovodíku čistými kulturami desulfurikačních bakterií v jejich logaritmické fázi růstové zůstává při různé



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

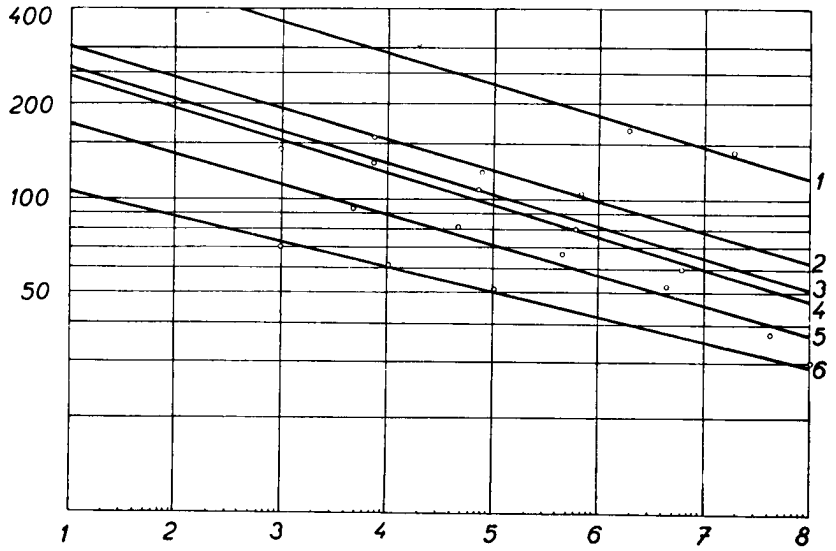
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

velikosti inokula stejná, t. j. vliv velikosti inokula se neprojevuje změnami rychlosti produkce sirovodíku v logaritmické fázi vývoje kultury.

2. Délka fáze zdržení (log fáze) — prakticky brána délka kultivační doby, potřebné pro produkci 100 mg $H_2S$/l — je nepřímo úměrná počtu očkovaných zárodků desulfurikačních bakterií.

3. Rychlost produkce sirovodíku, vyjádřená směrnicí křivek produkce sirovodíku v logaritmické fázi růstu kultur, je přímo úměrná hodnotě poměru D : I v použitém inokulu přečištěné kultury desulfurikačních bakterií.

4. Průvodní mikroflora I, obsažená v inokulu přečištěné kultury, inhibuje vývoj desulfurikačních bakterií a tím i produkci sirovodíku.




Obr. 2. Závislost délky kultivace, potřebné pro standardní produkci sirovodíku (100 mg/l) na počtu desulfurikačních bakterií v kulturách různě infikovaných. Osa $x$: log počtu D, osa $y$: délky kultivační doby v hod. pro produkci 100 mg $H_2S$/l, extrapolované z hodnot tabulek 2—7. Stupeň infekce kultur, vyjádřený poměrem D : I, je u přímky 1 roven 1,2 : 1; (přímka 2) 2,3 : 1; (přímka 3) 3,4 : 1; (přímka 4) 4,7 : 1; (přímka 5) 8 : 1; (přímka 6) 10 : 1).

První předpoklad nebyl přímo dokázán, neboť jsme nepracovali s čistou kulturou; bylo však prokázáno, že se zvyšující se hodnotou poměru D : I se mění směrnice produkčních křivek sirovodíku v závislosti na počtu zárodků D v inokulu jen nepatrně.

Druhý předpoklad potvrdily výsledky pokusů, v nichž jsme sledovali průběh produkčních křivek sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií o daném počtu D ve zřeďovacích pokusech; z obr. 2 je vidět, jak s klesajícím počtem D v kulturách se prodlužuje doba kultivace, potřebná pro produkci 100 mg $H_2S$/l.

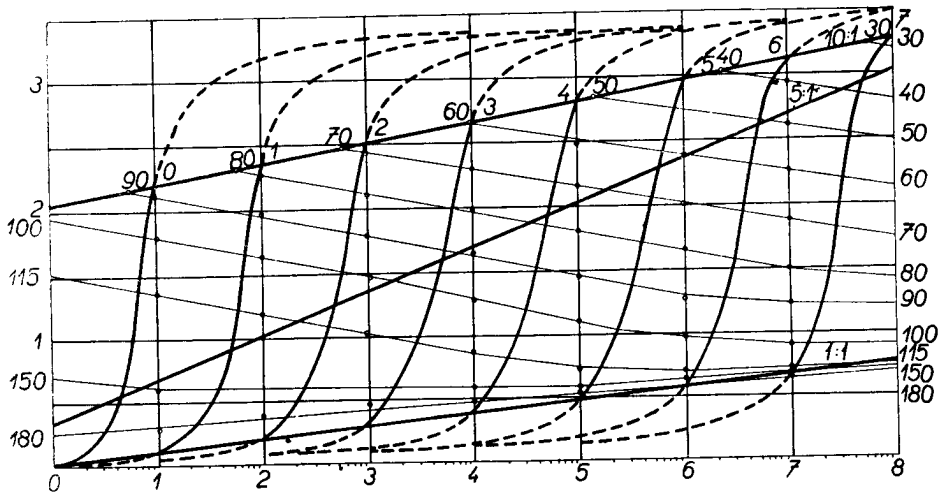
Třetí předpoklad potvrdily výsledky pokusů, v nichž jsme mikroskopicky sledovali stupeň znečištění kultur desulfurikačních bakterií, v pokusech užitých; průběh produkčních křivek sirovodíku, získaných z kultur s poměrem D : I = 1 : 1 až 10 : 1 prokázaly závislost hodnot směrnic na daném poměru D : I, t. j. hodnoty směrnic klesaly se zmenšující se hodnotou poměru D : I.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

K čtvrtému předpokladu možno uvést toto: mechanismus biochemického procesu růstu desulfurikačních bakterií v kulturách, obsahujících průvodní mikroorganismy, není v literatuře podrobně popsán. V našich pokusech se ukázalo, že inhibice vývoje desulfurikačních bakterií je přímo závislá na počtu kontaminantní infekce. Tento nález je v rozporu s údajem Stárkovým (1951), který zjistil, že přídavky extraktu z kontaminantní mikroflory (z kultury kmene *Bacillus subtilis*) měly do určité koncentrace stimulační účinek na produkci sirovodíku kulturami desulfurikačních bakterií; je zřejmé, že otázka vzájemného vztahu těchto organismů bude vyžadovat další studium.




Obr. 3. Nomogram k vyhodnocení počtu desulfurikačních bakterií. Osa $x$: (kolmá síť úseček) značí log počtu desulfurikačních bakterií (D), osa $y$: (vodorovná síť úseček) značí hodnoty směrnic křivek produkce sirovodíku v logaritmické fázi růstu kultur. Soustava křivek značí log počtu I; hodnoty řádů uvedeny v průsečíku kolmic pro log řádů D a přímky pro poměr D : I = 10 : 1. Plně vytažené úseky křivek jsou sestrojeny z experimentálních dat, čárkované značí předpokládaný průběh. Plně vytažené úsečky jsou spojnice bodů stejného poměru D : I v kulturách. Příslušné hodnoty poměru jsou vyznačeny u každé úsečky. Šikmá síť křivek značí spojnice hodnot délek kultivace, příslušných pro standardní produkci sirovodíku (100 mg $H_2S$/l).

Příklad čtení z nomogramu: je dána hodnota směrnice, vypočtená z produkční křivky sirovodíku, na př. 2,0 a počet log I (podle deskové analysy) na př. 1 . $10^3$.

Postup: stanovíme průsečík přímky pro směrnici 2,0 s křivkou pro log I 1 . $10^3$; z bodu průsečíku spustíme kolmici na abscissu a odečteme hodnotu počtu log D, v našem případě 6,2 . $10^3$. Současně stanovíme průsečík přímky směrnice s křivkami hodinové sítě; v našem případě vyčteme, že produkce 100 mg $H_2S$/l bylo dosaženo za 80 hodin.

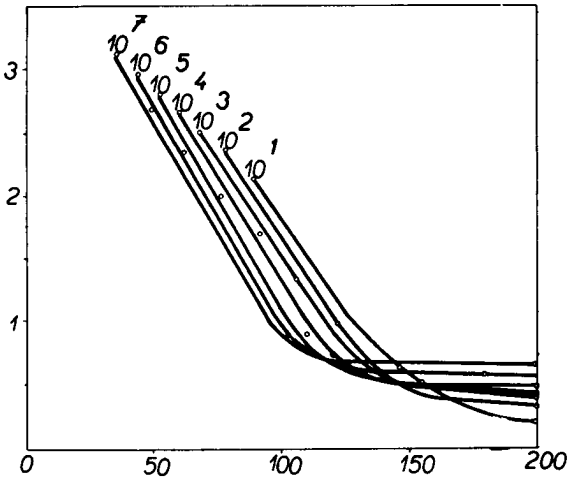
Vyhodnocovací nomogram byl sestaven z pokusných kultur, kde se poměr D : I pohyboval v rozmezí 1 : 1 až 10 : 1; v nomogramu jsou v této zoně vytaženy příslušné křivky plnými čarami, mimo tuto zomu byl průběh křivek extrapolován (čárkované křivky). Při tom jsme vycházeli z těchto úvah: pro poměr D : I, nižší než je hodnota 1, lze předpokládat, že směrnice budou hodnoty velmi nízké a že při relativně vysokých hodnotách I při nízkých hodnotách směrnic budou hodnoty D velmi nízké. Naopak pro poměry D : I, vyšší než je hodnota 10, lze předpokládat, že směrnice se budou blížit maximálním hodnotám, jejichž teoretická mez bude v daném grafickém systému mezi hodnotami 3,5 až 4,0. Zde zůstává problémem stanovit



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

hodnotu směrnice v kulturách, kde počet D je vyšší než $10^8$ zárodků v 1 ml; lze předpokládat, že od určité hodnoty D v kulturách se nebude již směrnice zvyšovat, takže pro extrémně vysoké počty D (nad $10^8$ v ml) nelze nomogramu užít.




Obr. 4. Závislost hodnot směrnic produkčních křivek sirovodíku v logaritmické fázi růstu kultur desulfurikačních bakterií na délce kultivace, potřebné pro standardní produkci sirovodíku (100 mg/l). Osa $x$: doba kultivace v hod. pro standardní produkci sirovodíku (100 mg/l), osa $y$: hodnoty směrnic produkčních křivek sirovodíku. Jednotlivé křivky získány z kultur o různém D (řád D uveden u každé křivky).

Jak je zřejmé z předcházejících odstavců, vypracovaná metoda je použitelná jen za určitých předpokladů (body 1—4); použijeme-li této metody k analyse mikroflory přirozených vod, dopouštíme se určitých nepřesností tím, že nebereme v úvahu všechny rozdílnosti mikrobiologických podmínek v těchto prostředích. V prvé řadě zanedbáváme chybu, pramenící z možnosti výskytu desulfurikačních bakterií o různé aktivitě a různé schopnosti produkovat sirovodík. Kvalitativní rozdílnost desulfurikačních bakterií by se mohla při analyse projevit rozdílnou délkou lag fáze, případně změnami v průběhu logaritmické fáze při stejném výchozím počtu zárodků. I když tuto možnost nemůžeme vyloučit, nelze ji také na základě předběžných výsledků považovat za podstatný rušivý faktor; při orientačních pokusech byly zjištěny u 89 kultur desulfurikačních bakterií, isolovaných z vod sirovodíkových pramenů a z ložiskových vod, nepatrné výkyvy v délce lag fáze a intensitě produkce sirovodíku (Dostálek a Spurný 1956).

Předpoklady, z nichž jsme vycházeli při vypracování metody, nepostihují také dokonale kvalitativní rozdíly v průvodní mikrofloře. Mikroorganismy, mající vztah k desulfurikačním bakteriím, se mohou projevovat v přirozených podmínkách jednak vlivem inhibičním i stimulačním. Působení synergických bakterií by se mohlo uplatnit zejména produkcí růstových látek, vytvářením redukčnějších podmínek nebo zlepšením přístupu živin. Vlivy tohoto druhu byly vyloučeny vhodnou úpravou živné půdy přidáním kvasničného extraktu a siřičitanu sodného i použitím mléčnanu, který je dobře asimilován desulfurikačními bakteriemi. Na druhé straně vliv antagonické mikroflory může být mnohostranný a nelze jej vždy vyloučit úpravou kultivačních podmínek; jde především o možnost produkce kyselin, antibiotik, oxydaci sirovodíku, intensivnější spotřebu živin a j. Tyto inhibiční vlivy mohou být ovšem rozdílné podle druhu průvodné mikroflory. Hodnota I není proto při obecném použití navrhované metody brána jako absolutní hodnota počtu zárodků určité bakterijní skupiny, ale jako míra intensity inhibičního působení průvodních bakterií. V tomto pojetí nemusí mít metodické zjednodušení mikrobijních poměrů ve vodách nepříznivý vliv na obecné použití navrhované metody.

Jak již bylo uvedeno v úvodu, byla metoda vypracována pro hydromikrobiologický průzkum naftonadějných oblastí. Použití klasických metod stanovení počtu bakterií (deskové nebo zřeďovací) není vhodné pro tyto účely. Při těchto metodách se pracuje isolovaně s kulturami studovaných skupin a není možno zpravidla přihlížet k mikroorganismům průvodním, které v přirozených podmínkách ovlivňují aktivitu příslušné fysiologické skupiny. Tento nedostatek jsme se snažili odstranit při vypracované analytické metodě tím, že kultivační podmínky i způsob sledování aktivity bakterií byly upraveny tak, aby umožňovaly zachycení vlivu průvodní



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

mikroflory. Byli jsme si vědomi toho, že sledování metabolismu směsných kultur je otázka složitá, o čemž svědčí skutečnost, že s metodami pro práce tohoto druhu se prakticky v literatuře nesetkáváme.

Složení mikrobijních asociací ve studovaném materiálu, v hlubinných vodách, je velmi různorodé, takže nebylo možno vyhnout se jisté schematisaci; jestliže však metoda, jak jsme prokázali, dává možnost hodnocení vlivu průvodní mikroflory, brzdící produkci sirovodíku desulfurikačními bakteriemi, je ji možno s hlediska vytčeného cíle považovat za vyhovující. Poskytuje totiž možnost určení počtu desulfurikačních bakterií a současně i zjištění, do jaké míry může být jejich aktivita brzděna v přirozených podmínkách jinými biologickými činiteli.

*Souhrn*

1. Vypracovali jsme kvantitativní metodu stanovení počtu desulfurikačních bakterií, jejíž princip spočívá ve srovnání křivek produkce sirovodíku v kulturách, připravených z vod sirovodíkových pramenů, se standardními produkčními křivkami, získanými z kultur desulfurikačních bakterií o známém počtu zárodků v 1 ml.

2. Použití této metody pro potřeby hydrologického průzkumu naftonadějných oblastí vyžadovalo pracovat se směsnými kulturami.

3. Zhotovili jsme vyhodnocovací nomogram, který dovoluje stanovit počet desulfurikačních bakterií v kulturách v řádovém rozpětí $10^1$ až $10^8$ zárodků v 1 ml.

Literatura

Dostálek, M., Spurný, M.: *Kultivační charakteristiky desulfurikačních bakterií z naftových ložisek.* Čs. mikrobiol. 1 : 158, 1956.

Ekzercev, V. A., Kuzněcov, S. I.: *Issledovanija mikroflory neftenosnych mestorožděnij Vtorovo Baku.* Mikrobiologija 23 : 3, 1954.

Gahl, R., Anderson, B.: *Sulphate reducing bacteria in California oil waters.* Zbl. Bakter. II, 73 : 331, 1928.

Gartner, O.: *O geologickém původu moravsko-slezských minerálních pramenů.* Časopis Vlastivěd. spolku musej. v Olomouci 12 : 1, 1929.

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

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

Isačenko, V.: *On the microorganisms of the lower limits of the biosphere.* J. Bact., 40 : 379, 1940.

Kupzis, J.: *Die biochemischen Vorgänge im Schweffel- und Moorbade Kemmern in Lettland.* Zbl. Bakter. 76, 1928.

Mahel, M.: *Minerálne pramene Slovenska so zretelom na geologickú stavbu.* Práce Štát. geol. ústavu, Bratislava (27), 1952.

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

Spurný, M., Dostálek, M.: *Mikrobiologie hlubinných vod naftonadějných oblastí.* Práce Ústavu pro naftový výzkum, Brno 1956. V tisku.

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

Šturm, L. D.: *Materialy po mikrobiologičeskomu issledovaniju neftjanych mestorožděnij Vtorovo Baku.* Trudy Inst. nefti 1 : 97, 1950.

Úlehla, J., Spurný, M., Dostálek, M.: *Použití tečkovací reakce na sirovodík při sledování síranové redukce.* Čs. mikrobiol. 1 : 267, 1956.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

## Метод количественного подсчета сульфатвосстанавливающих бактерий

*М. Спурный, М. Досталек и Ю. Улегла*

Резюме

Был выработан метод количественного определения сульфатвосстанавливающих бактерий, основанный на сравнении кривых выделения сероводорода в культурах из вод сероводородных источников и стандартных кривых продукции, получаемых из смешанных культур сульфатвосстанавливающих бактерий при известном количестве бактерий в 1 мл. Была составлена интерпретационная номограмма, позволяющая определить количество сульфатвосстанавливающих бактерий культуры в пределах порядков от $10^1$ до $10^8$ бактерий/1 мл. — Результатам и пределам практического применения предлагаемого метода прослеживания активности сульфатвосстанавливающих бактерий в глубинных водах перспективных в отношении нефтеносности районов будет посвящена отдельная статья.

## A Method for Evaluating the Sulphate Reducing Bacteria

*M. Spurný, M. Dostálek and J. Úlehla*

Summary

A quantitative method for estimating the number of sulphate reducing bacteria was developed, the principle of which is based upon a comparison between the hydrogen sulphide production curves from waters under examination and standard production curves, obtained from mixed cultures of sulphate reducing bacteria of a known number of organisms per ml. A nomogram for evaluating the number of sulphate reducing bacteria in cultures in limits of $10^1-10^8$ organisms per ml. was constructed. The results and limits of practical application of the method proposed for studying the activity of sulphate reducing bacteria of underground waters in oil bearing areas will be discussed in a next paper.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

*Československá*

MIKROBIOLOGIE

*ročník 1. (1956) — č. 6*

# K otázke vírusových receptorov

## O elektívnej aglutinabilite syslích erytrocytov

LADISLAV BORECKÝ

Virologický ústav ČSAV, Bratislava

*Došlo 8. 5. 1956*

Objavenie fenoménu vírusovej hemaglutinácie Hirstom (1941) umožnilo vypracovanie rozličných metód titrácie viacerých vírusov, resp. vírusových protilátok. O význame objavu svedčí i to, že našiel uplatnenie i pri jemnejšej analýze vlastností vírusov, napr. pri zostavení receptorového gradienta (Burnet, McCrea a Stone 1946), pri určovaní spektra aglutinovaných druhov erytrocytov určitým vírusom (Horvath a spol. 1950), pri zisťovaní charakteru adsorpčnej a elučnej krivky určitého vírusu (Koziński a spol. 1953) atď.

Ukázalo sa, že ide o zjav vo svete vírusov a mikroorganizmov vôbec veľmi rozšírený, presahujúci rámec vírusov zo skupiny mumps-newcastelská choroba-chrípka. Schopnosť hemaglutinovať za vhodných pomienok sa zisťuje u stále väčšieho počtu vírusov (Rivers 1952, Gajdamovič-Šubladze 1954, Sweet 1954). O povahe tohto fenoménu sa nemožno ani dnes, t. j. po 15 rokoch, definitívne vysloviť, je však mnoho dôvodov pre to, aby sme ho považovali za fermentatívny dej, pri ktorom — aspoň v prípade vírusov zo skupiny mumps-newcastelská choroba-chrípka (v ďalšom MNCh) — dochádza k rozkladu receptorovej substancie, uloženej na povrchu alebo v stene bunky (Hirst 1942, Burnet, McCrea a Stone 1946, Hanig 1948, Ada a Stone 1950, Gottschalk 1953, Kradolfer 1954). Je pravdepodobné, že pozorovaná aglutinácia erytrocytov vírusmi zo skupiny variolovakcína-ektromélia-meningopneumónia je podmienená inými faktormi (fosfolipidy — Burnet a Stone 1946, Stone 1946) a zas iný, dosiaľ neznámy, mechanizmus sa uplatňuje pri hemaglutinácii spôsobenej neurovírusmi a vírusom slintačky a krívačky. Podľa Hirsta (cit. Rivers 1952) priebeh adsorpcie v tomto prípade pripomína dvojfázovú adsorpciu fága na vnímavú bunku (Garen a Puck 1951).

Fenomén hemaglutinácie je častým predmetom bádania i preto, že je modelom interakcie vírusu s bunkou. I keď sa dá proti tejto koncepcii namietnuť, že v krvinkách sa vírus (podľa našich dnešných znalostí) nemnoží, je predsa viac argumentov, ktoré odôvodňujú takéto štúdie. Nemôže byť totiž pochybnosti o tom, že 1. prvá fáza interakcie vírusu s bunkou — výsledkom krotej môže byť, podľa povahy bunky, tak infekcia, ako aglutinácia — je podmienená tými istými faktormi (Gottschalk 1953); 2. mechanizmy brániace aglutinácii bránia i infekcii (enzým rozkladajúci receptory Stone 1948, Fazekas de St. Groth 1948, Gottschalk 1953, polysacharidy Horsfall a Ginsberg 1949; chlorofylín Barnard 1954); 3. niektoré vírusy sú schopné aglutinovať nielen krvinky, ale i iné živočíšne bunky (napr. spermie, fibroblasty, Chu 1953).

To, čo sme povedali, odôvodňuje i našu štúdiu, v ktorej poukazujeme na existenciu špecifikovanej receptorovej substancie na povrchu syslích erytrocytov, vstupujúcich do elektívnej reakcie s niektorými predstaviteľmi skupiny MNCh.

### *Materiál a metódy*

*Krvinky.* Erytrocyty sysľa *(Citellus citellus)* sme získali srdcovou punkciou. Zvieratá znášali opakovaný odber 0,7 až 1,0 ml krvi bez ťažkostí. Syslie erytrocyty majú priemer 5—6 μ, sú bezjaderné, okrúhle. Na rozdiel od erytrocytov iných laboratórnych zvierat boli vyšetrované vzorky syslích erytrocytov Rh-pozitívne a mali skupinový AB antigén. Erytrocyty sme trikrát preprali vo fyziologickom roztoku a udržovali pri + 4 °C v 20% suspenzii.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Slepačie erytrocyty sme získali tiež srdcovou punkciou. Spracovali sme ich obdobne ako syslie. V pokusoch sme skúšali oba druhy krviniek obyčajne paralelne.

*Vírus.* V práci sme použili tieto druhy a typy vírusov: 1. Vírus chrípky typ A: kmene PR 8, Weiss; typ A′: FM1, Rhodes a Sweden, $H_2$ 52, Čs 4/54, Čs 5/54, Čs 6/54; typ B: Lee, Čs/49, Čs 1/1952, Čs 4/1952, Čs 3/1952; typ C: C-1233 (Taylor), RM 13/53-Hung, Čs 1/1952, Čs 3/52. 2. Vírus chrípky prasiec: Infl. suis-55 (Sw-55). 3. Vírus mumpsu: kmeň Henle (Mu). 4. Vírus newcastelskej choroby: kmeň Bratislava (NDV). 5. Vírus vakcínie: kmeň „Biogena" (Vakc.).

*Enzým rozkladajúci receptory (RDE):* Pripravili sme ho z kmeňa V. cholerae 4Z pasážou cez alantoický vak 12dňových kuracích embryí. Alantoická tekutina vybraná z vajec 24 hodín po infekcii kmeňom 4Z — po scentrifugovaní — tvorila surový preparát RDE. Jeho titer sme stanovili podľa Burneta a Stonea (1946). Titer bol obyčajne 1 : 512—1024.

*Hemaglutinačné titre* sme robili skúmavkovou metódou (Blaškovič a sp. 1953). Krvinky sme obyčajne použili v 0,5% koncentrácii. Fyziologický roztok sme robili z redestilovanej vody s 0,85 % NaCl.

*Rozloženie receptorov krviniek pôsobením vírusov* sa robilo podľa Whitea (1953). K alantoickej tekutine obsahujúcej vírus sa pridali skúmané erytrocyty v takom množstve, aby tvorili v nej 10% suspenziu. Zmes sa udržovala 4 hod. pri 37 °C. Potom sa erytrocyty trikrát preprali fyziologickým roztokom a po zriedení na 0,5 % (vo fyziolog. roztoku) sa testovali na stabilitu (spont. aglutináciu). K nestabilným erytrocytom (obyčajne po pôsobení vírusu LEE) sa pridalo v rovnakom pomere príslušné imúnne sérum riedené 1 : 50 a zmes sa udržovala cez noc pri + 4 °C. Kontrolu tvorili krvinky suspendované vo fyziolog. roztoku za rovnakých podmienok inkubácie. Stupeň rozloženia sa zisťoval v hemaglutinačnom teste pomocou 6 štandardných kmeňov vírusov zo skupiny MNCh.

*Rozloženie receptorov krviniek pôsobením RDE.* Osvedčila sa nám i tu mierne upravená metóda Whitea (1953). Preparát RDE sme riedili vo fyziolog. roztoku tak, aby na 1 ml pripadlo 1000 až 31 jednotiek RDE. K týmto riedeniam RDE sme pridali erytrocyty v takom množstve, aby tvorili 10% suspenziu. Zmesi sme uložili na 4 hod. pri 37 °C, potom sme k nim pridali 5% citrát sodný do 2 obj. %. Účelom pridania citrátu sodného je zastaviť pôsobenie RDE. Nasledovala centrifugácia suspenzií a dvojnásobné premytie fyziologickým roztokom. Kontrolu tvorili erytrocyty suspendované vo fyziologickom roztoku a inkubované za rovnakých podmienok ako erytrocyty suspendované v riedeniach RDE. Stupeň rozloženia vírusových receptorov sme zisťovali v hemaglutinačnom teste šiestimi štandardnými vírusmi zo skupiny MNCh.

*Priebeh adsorpcie a elúcie vírusov na erytrocytoch.* Sledovali sme ju pomocou metodiky Kozińského, Mikulaszeka a Siteka (1953). Do sady skúmaviek sme dali po 0,2 ml 20 % erytrocytov a po 1 ml vírusovej tekutiny. Po dôkladnom premiešaní sme skúmavky uložili pri 0 °C na 1—2 hod. V určitých intervaloch sme jednotlivé skúmavky vybrali, scentrifugovali a v tekutine nad úsadkom sme zisťovali hemaglutinačným testom množstvo neadsorbovaného vírusu.

Pri elúcii sme postupovali vo väčšine prípadov tak, že po predchádzajúcej adsorpcii pri 0 °C sme suspenzie scentrifugovali a tekutinu nad úsadkom (pôvodnú vírusovú tekutinu) sme nahradili rovnakým objemom fyziologického roztoku o pH 7,2. Suspenzie sme preniesli do termostatu (37 °C) a v určitých intervaloch, obyčajne polhodinových, sme v scentrifugovaných vzorkách zisťovali hemaglutinačným testom množstvo eluovaného vírusu. V iných prípadoch sme po adsorpcii pôvodnú vírusovú tekutinu nevymenili, ale sme zisťovali postupné pribúdanie vírusu v tekutine nad úsadkom v priebehe inkubácie suspenzií pri 37 °C.

## *Výsledky*

Zistili sme, že syslie erytrocyty sa aglutinujú vírusmi chrípky typu B a C a atypicky vírusom newcastelskej choroby (NDV). Atypičnosť sa prejavovala v stálej prítomnosti prozóny. Nikdy sme nepozorovali aglutináciu syslích erytrocytov vírusmi chrípky typu A a A′, vírusom chrípky prasiec, vírusom mumpsu a vírusom vakcínie. Kým hemaglutinačné titre (s 0,5% erytrocytmi) skúšaných B kmeňov vírusu chrípky boli asi rovnako vysoké ako pri použití slepačích erytrocytov, vírusy typu C aglutinovali syslie erytrocyty asi do 4—8krát nižšieho titru ako slepačie. Aglutinácia syslích erytrocytov bola pri 0 °C, + 4 °C a pri izbovej teplote asi rovnakého stupňa, pri teplote 37 °C sa nepozorovala.

Elektívnu aglutinabilitu sme v prípade 5 B kmeňov potvrdili vírusovými tekutinami desiatich rozličných vaječných pasáží (kmeň Lee bol zo 154. pasáže, ostatné kmene z 11. až 48. pasáže), v prípade 4 C kmeňov na materiáli z 5 pasáží (8. až 17.). Opakované skúšky aglutinability syslích erytrocytov s inými predstaviteľmi vírusov zo skupiny MNCh boli za rôznych podmienok teploty a trvania inkubácie opätovne



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

negatívne. Z tohoto nášho poznatku vyplýva možnosť praktického použitia syslích erytrocytov ako pomôcky pre určenie typu neznámeho vírusu (tabuľka 1).

Vlastnosti vírusových receptorov na syslích erytrocytoch sa študovali najmä z hľadiska vzťahu k 2 vírusom, ktorými sa tieto erytrocyty aglutinujú: vírusu Lee (typ B) a vírusu C (Čs 1952).

Tab. 1. Schematické rozdelenie vírusov podľa ich schopnosti aglutinovať syslie erytrocyty.

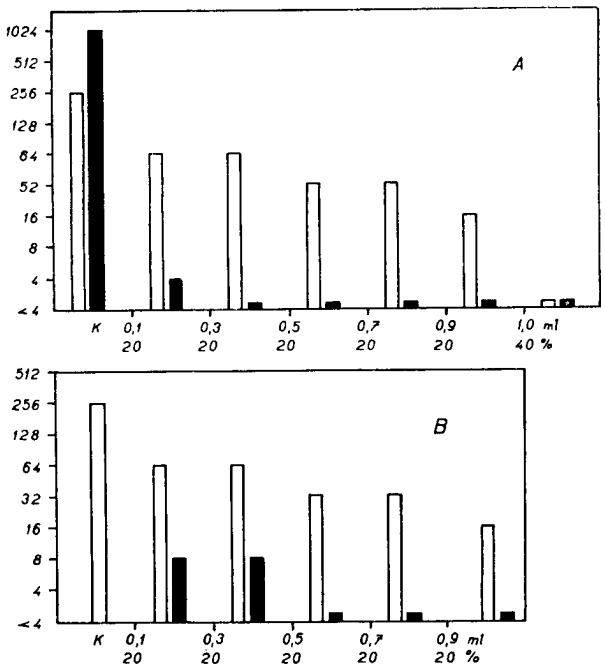
| Aglutinácia syslích erytrocytov | Pravdepodobný druh (typ) ví usu |
|---|---|
| + | 1. vírus chrípky typ B |
| | 2. vírus chrípky typ C |
| | 3. (vírus newcastelskej choroby) |
| — | 1. vírus chrípky typ A |
| | 2. vírus chrípky typ A′ |
| | 3. vírus chrípky prasiec |
| | 4. vírus mumpsu |
| | 5. vírus vakcínie |

V zátvorke — hemaglutinácia s prozónou.

Štúdium dynamiky adsorpcie vírusov Lee a C na syslie erytrocyty ukázalo, že vírus Lee sa adsorpuje už počas ½ hodiny temer kvantitatívne, kým pre vírus C je stupeň adsorpcie úmerný množstvu erytrocytov pridaných k vírusovej tekutine (obr. 1).

Na obr. 1 B je znázornená adsorbcia vírusu C na syslie erytrocyty po ich predchádzajúcej expozícii neriedenému preparátu RDE. Zisťujeme, že stupeň adsorpcie na takto spracované erytrocyty je väčší v porovnaní s rovnakým množstvom normálnych syslích erytrocytov. Takýto účinok RDE na slepačie erytrocyty sme nepozorovali.

Obr. 2 znázorňuje časový priebeh adsorpcie a elúcie vírusov Lee a C na syslích a slepačích erytrocytoch (množstvo erytrocytov 0,4 ml — 50 % na 1 ml vírusovej tekutiny). Vidíme, že krivka adsorpcie a elúcie v tomto typickom experimente prebieha na syslích a slepačích erytrocytoch podobne. Graf súčasne ukazuje, že predchádzajúca adsorpcia a elúcia vírusu Lee na erytrocyty neovplyvňuje v podstate krivku adsorpcie a elúcie vírusu C na syslích a slepačích erytrocytoch. Na slepačích erytrocytoch podobný zjav pozoroval už Hirst (1950).



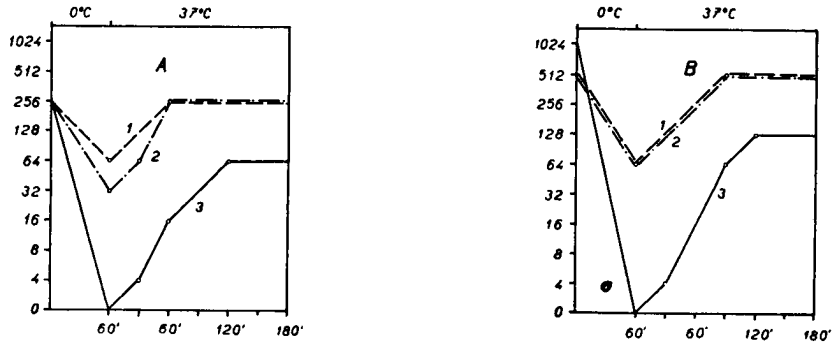

Obr. 1. A. Stupeň adsorpcie Lee a C vírusu na rozličné množstvá syslích erytrocytov pri 0 °C. Prázdny stĺpec — vírus C, plný stĺpec — kmeň Lee. B. Adsorpcia C vírusu na syslie erytrocyty po predchádzajúcom pôsobení RDE na krvinky. K — kontrola, prázdny stĺpec — vírus C, plný stĺpec — vírus C po RDE. Osa $x$: množstvo erytrocytov v ml, 20% a 40% konc. Osa $y$: titer aglutinácie.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Pri sledovaní schopnosti jednotlivých vírusov skupiny MNCh rozkladať vírusové receptory na syslích a slepačích erytrocytoch sme opakovane pozorovali zaujímavý zjav zvýšenia aglutinability syslích erytrocytov vírusom C po predchádzajúcom pôsobení na tieto erytrocyty vírusom Lee. Tento zjav bol špecifický pre syslie




Obr. 2. Priebeh adsorpcie a elúcie vírusov Lee a C na syslích (A) a slepačích (vtáčich — B) erytrocytoch. Krivka 1 — C po Lee, 2 — C, 3 — Lee. Os $x$: čas v minútach pri 0 a 37 °C, os $y$: titer aglutinácie.

Tabulka 2,

Pôsobenie vírusov na receptory slepačích a syslích erytrocytov

| Erytrocyty po pôsobení vírusu | Slepačie erytrocyty | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hemaglutinačné testy s vírusmi | | | | | | |
| | PR 8 | LEE | A'-54 | C-52 | NDV | Mu | Sw-55 |
| LEE | 256 | 512* | 256 | 2048 | — | — | 512 |
| C-52 | 512 | 512 | 512 | — | 1024 | — | 256 |
| NDV | 128 | 256 | 256 | 2048 | — | — | 256 |
| Sw-55 | 512 | 512 | 512 | 2048 | 1024 | — | 512 |
| Kontrola | 512 | 512 | 512 | 2048 | 2048 | 64 | 512 |

* Titer LEE po pôsobení vírusu LEE v niektorých prípadoch klesol až na 25 %, v iných sa nemenil.

| Erytrocyty po pôsobení vírusu | Syslie erytrocyty | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hemaglutinačné testy s vírusmi | | | | | | |
| | PR 8 | LEE | A'-54 | C-52 | NDV | Mu | Sw-55 |
| LEE | — | 128 | — | 4096 | — | — | — |
| C-52 | — | 256 | — | — | 512 | — | — |
| NDV | — | 256 | — | 256 | — | — | — |
| Sw-55 | — | 256 | — | 256 | 256 | — | — |
| Kontrola | — | 512 | — | 128 | 512 | — | — |

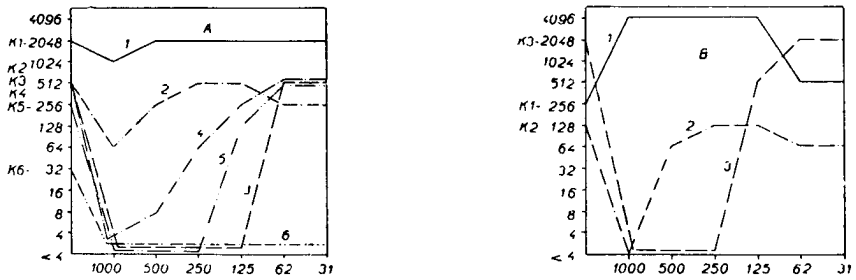
erytrocyty, pretože v prípade slepačích erytrocytov zistené titre nikdy nepresahovali rámec technických chýb. Typický experiment znázorňuje tab. 2 (so slepačími a syslími erytrocytmi). Z pokusov vyplýva i to, že pôsobenie rozličných vírusov na syslie erytrocyty neovplyvňuje elektívnu aglutinabilitu týchto erytrocytov (krvinky nenadobudli schopnosť aglutinovať sa vírusmi chrípky A, A', mumpsu a prasačej chrípky).



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Podobný účinok ako vírus Lee mali i vzorky RDE v tom zmysle, že hemaglutinačný titer syslích erytrocytov s vírusom C značne stúpol po predchádzajúcej inkubácii s preparátom RDE (1000—250 j). Receptorový gradient na základe pôsobenia RDE znázorňuje obr. 3. Správnosť použitej metodiky potvrdzujú výsledky získané so slepačími erytrocytmi, ktoré sú v súlade s výsledkami uvedenými v literatúre (Burnet, McCrea a Stone 1946, Burnet a Stone 1946, Koziński a Slonim 1952a, b, obr. 2 A).




Obr. 3. Účinok RDE na receptory slepačích (A) a syslích (B) erytrocytov. Krivka 1 — C 52, 2 — Lee, 3 — NDV, 4 — A′ 54, 5 — PR 8, 6 — Mu. K — titry v kontrole. Os $x$: množstvo jednotiek RDE, os $y$: titer aglutinácie.

*Diskusia*

V práci sme podrobili biologickému štúdiu vírusové receptory syslích erytrocytov. Kontrolou výsledkov i metodiky boli pokusy na slepačích erytrocytoch. Zistili sme elektívnu aglutinabilitu syslích erytrocytov vírusmi B, C a NDV a predkladáme toto zistenie ako pomôcku pre diagnostiku novoizolovaného alebo neznámeho vírusu. Porovnanie aglutinačných a adsorpčných schopností rozličných erytrocytov sa robilo i doteraz (Hirst 1942, Burnet a Stone 1946, Horvath a spol. 1950, Farkas 1950, Koziński 1953 a iní), ale na elektívnu aglutinabilitu vnútri skupiny MNCh upozornil len Tamm (1954) na modeli mačacích erytrocytov. V práci Horvatha a spol. (1950) nachádzame zistenie o aglutinabilite škrečích erytrocytov vírusom Lee, nie však vírusom PR 8 a NDV. Autori však tomu nevenovali ďalšiu pozornosť.

Domnievame sa, že štúdium a porovnanie erytrocytov so špecifikovanými receptormi, rozšírené najmä o biochemickú analýzu, by mohlo vniesť ďalšie svetlo do otázky vírusových substrátov a teda i do otázky patogenézy vírusových chorob. Pôsobenie vírusu Lee a koncentrovanejších vzoriek RDE na syslie erytrocyty viedlo k dosiaľ nepozorovanému zjavu stúpnutia hemaglutinačného titra pri použití vírusu C.

Naše výsledky neumožňujú exaktné vysvetlenie tohto zjavu, ale dovoľujú vidieť v ňom ďalší dôkaz pre potvrdenie koncepcie Kozińského a Slonima (1952, Slonim 1953) o vrstevnatom usporiadaní vírusových receptorov na povrchu erytrocytov. Uvedení autori pri svojej koncepcii vychádzali zo zisteného postupného odbúravania povrchnejšie uložených receptorov vírusmi, stojacími na predných pozíciach receptorového gradientu. Štúdium syslích erytrocytov nás nabáda prijať túto koncepciu na základe poznatku, že neriedenými preparátmi RDE a pôsobením vírusu Lee (ktorý stojí pre slepačie erytrocyty na konci gradientu) je možné odhaliť receptory pre vírus C ináč prekryté určitými, zatiaľ nedostatočne známymi štruktúrami bunkového povrchu.

Pre toto „obnaženie" receptorov svedčí i skutočnosť, že po pôsobení RDE sa zväčšil i stupeň adsorpcie C vírusu na syslie erytrocyty, čo sa u slepačích krviniek nepozorovalo. Nepodarilo se nám však zistiť zväčšenie stupňa adsorpcie vírusu C na syslie



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

erytrocyty po pôsobení vírusu Lee. Túto otázku zatiaľ nechávame otvorenú. Na nesúlad medzi aglutinabilitou a adsorpčnou schopnosťou poukázali i iní (Hirst 1950, Horvath a spol. 1950). Môžeme predpokladať, že napriek značnej podobnosti medzi účinkom vírusov a RDE je tu i určitý jemný rozdiel, ktorý sa mohol uplatniť i v našich pokusoch. Na tento rozdiel z hľadiska poradia jednotlivých zástupcov receptorového gradientu poukázala už Stoneová (1947).

Pokusy ovplyvniť aglutinabilitu syslích erytrocytov pomocou fermentatívneho pôsobenia na erytrocyty, a to trypsínom a diastázou, boli neúspešné, preto sa o nich nezmieňujeme.

## *Súhrn*

1. Zistili sme, že erytrocyty sysľa *(Citellus citellus)* sa aglutinujú vírusom chrípky typu B a C a vírusom newcastelskej choroby a neaglutinujú sa vírusmi typu A, A′, mumpsu, chrípky prasiec a vakcínie.

2. Tento zjav možno využiť ako diagnostickú pomôcku pri určení typu neznámeho kmeňa.

3. Prispeli sme k otázke povrchového rozmiestenia vírusových receptorov na krvinkách zistením, že receptory pre C vírus sú čiastočne kryté bunkovými štruktúrami, ktoré pôsobením vírusu Lee a RDE možno odstrániť a tým receptory „obnažiť".

Za technickú spoluprácu ďakujem L. Maasovej.

## Literatúra

Ada, G. L., Stone, J. D.: *Electrophoretic studies of virus-red cell interaction: Mobility gradient of cells treated with viruses of the influenza group and the receptor-destroying enzym of V. cholerae.* Brit. J. Exp. Path. 31 : 263, 1950.

Barnard, R. D., Goldman, B., Stanton, H. T.: *Mechanism of suppression of hemaglutinating viruses.* Science 119 : 3090, 1954.

Blaškovič, D. a spol.: *Laboratórne metódy vo virológii.* Bratislava 1953.

Burnet, F. M., Stone, J. D.: *The hemaglutinins of vaccinia and ectromelia viruses.* Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 24 : 1, 1946.

Burnet, F. M., Stone, J. D.: *The receptor destroying enzyme of Vibrio cholerae.* Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 25 : 227, 1947.

Burnet, F. M., McCrea, J. F., Stone, J. D.: *Modification of human red cells by virus action. I. The receptor gradient for virus action in human red cells.* Brit. J. Exp. Path. 27 : 228, 1946.

Farkas, E.: *Characterisation of virus strains based on their action on red blood cells.* Acta physiol. Hung. 2 : 87, 1950.

Fazekas de St. Groth, S.: *Destruction of influenza virus receptors in the mouse lung by an enzyme from V. cholerae.* Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26 : 29, 1948.

Gajdamovič-Šubladze, A. K.: *Kratkij kurs praktičeskoj virusologiji.* Moskva 1954.

Garen, A., Puck, T. T.: *The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses. II.* J. Exp. Med. 94 : 174, 1951.

Gottschalk, A.: *The initiation of cellular infection by viruses.* Z knihy: *The dynamics of virus and rickettsial infections.* New York 1953.

Hanig, M.: *Electrokinetic change in human erythrocytes during adsorption and elution of PR 8 influenza virus.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68 : 385, 1948.

Hirst, G. K.: *The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.* Science 94 : 22, 1941.

Hirst, G. K.: *Adsorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells.* J. Exp. Med. 76 : 195, 1942.

Hirst, G. K.: *The relationship of the receptors of a new strain of virus to those of the mumps-NDV-influenza group.* J. Exp. Med. 91 : 177, 1950.

Hirst, G. K.: Stať v knihe T. Rivers: *Viral and rickettsial infection of man.* Philadelphia 1952.

Horsfall, F., Ginsberg, H.: *The chemotherapy of virus infections.* Z knihy: *Evaluation of chemotherapeutic agents.* New York 1949.

Horvath, I., Szollösy, E., Ivanovics, G.: *Distribution of the receptor substance of the influenza and related viruses in the tissue-elements of different animal species. I. The virus adsorbing capacity and agglutinability of the erythrocytes of various vertebrates.* Acta physiol. hung. 3 : 77, 1950.

Chu, H. P.: *The agglutination of spermatozoa by viruses of influenza, mumps and newcastle diseas.* Riass. delle comunicaz. VI. congr. internaz. di microbiol. Roma 2 : 20, 1953.



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Koziński, A. W., Mikulaszek, E., Sitek, K.: *Badania nad gradientem receptorowym.* Med. dosw. i. mikr. 5 : 457, 1953.
Koziński, A. W., Slonim, D.: *Vliv endotoxických komplexů S. typhosa na virusovou haemaglutinaci.* Čas. lék. čes. 91 : 1054, 1952a.
Koziński, A. W., Slonim, D.: *Vplyv frakcji komórkovych S. typhosa na hemaglutinację wirusową.* Medyc. dosw. mikr. 2 : 217, 1952b.
Kradolfer, Fr.: *Fermenthemmung und Virushemmung.* Schw. Zschr. Path. Bact. 17 : 520, 1954.
Rivers, T.: *Viral and rickettsial infection of man.* Philadelphia 1952.
Slonim, D.: *Příspěvek ke studiu vzájemných vztahů mezi buňkou a virusy skupiny parotitis-newcastelská nemoc-chřipka.* Čs. HEMI 2 : 176, 1953.
Stone, J. D.: *Lipid hemagglutinins.* Austral. J. Exp. Biol. Med. 74 : 501, 1946.
Stone, J. D.: *Comparison of the action of V. cholerae enzyme and viruses on the red cell surface.* Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 25 : 137, 1947.
Stone, J. D.: *Prevention of virus infection with enzyme of V. cholerae. I. Studies with viruses of mumps-influenza group in chick embryos.* Austral. Exp. Biol. Med. Sci. 26 : 49, 1948.
Sweet, B. H.: *Properties and antigenic relationship of hemagglutinins associated with the dengue viruses.* J. Immunol. 73 : 363, 1954.
Tamm, I.: *Influenza virus-erythrocyte interaction. I. Reversible reaction between Lee virus and cat erythrocytes.* J. Immunol. 73 : 180, 1954.
White, J.: *The position of Taylors 1233 strain of virus in the human red cell receptor gradient.* Brit. J. Exp. Path. 43 : 668, 1953.

## К вопросу вирусных рецепторов

### Об избирательной агглютинируемости эритроцитов суслика

*Л. Борецкий*

Резюме

Мы установили, что эритроциты суслика (Citellus citellus) агглютинируются вирусами гриппа типа B и C и вирусом ньюкасльской болезни и не агглютинируются вирусами типа A и $A_1$, паротита, гриппа свиней и вакцинии. Это явление можно использовать как диагностический критерий при определении типа неизвестного штамма. В вопросе размещения вирусных рецепторов на поверхности кровяных телец мы установили, что рецепторы для вируса C отчасти перекрываются клеточными структурами, однако воздействуя на эти структыры вирусом Lee или RDE, их можно устранить и «обнажить» рецепторы.

## Concerning the Question of Virus Receptors

### The Elective Agglutinability of the Erythrocytes of the Ground Squirrel

*L. Borecký*

Summary

It was found that the erythrocytes of the ground squirrel (Citellus citellus) are agglutinated by the virus of influenza of the B and C types and by the virus of Newcastle disease, but not by the viruses of influenza A and A′, mumps, swine influenza or vaccinia. This may be used as a diagnostic aid in determining the type of an unknown strain. A contribution was made to the question of the surface distribution of virus receptors on the blood cells by the finding that the receptors for the influenza C virus are partially covered by cellular structures which can be removed by the action of the Lee and RDE viruses, thus „exposing" the receptors.

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 17. prosince 1956. - A-22048



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

## СОДЕРЖАНИЕ

Беран, К. и Бургер, М.: Изучение оптимальных условий осахаривания картофельных заторов плесневыми ферментными препаратами . . . . . 97
Беран, К., Бургер, М. и Зеленка, С.: Новые данные, полученные при использовании грибковых амилолитических препаратов для сахарификации картофельных заторов. Полупроизводственные опыты с грибковыми препаратами при выработке спирта из картофеля . . . . . 193
Борецкий, Л.: К вопросу вирусных рецепторов. Об избирательной агглютинируемости эритроцитов суслика . . . . . 282
Бургер, М. и Беран, К.: О трансглюкозидационной деятельности энзиматического препарата плесени Aspergillus niger . . . . . 26
Бургер, М., Рокос, И. и Прохазка, П.: Влияние хлортетрациклина на активность α-амилазы . . . . . 105
Винтер, В.: Спорообразование бацилл. II. Протеолитические энзимы в процессе спорообразования у Bacillus megatherium . . . . . 63
Винтер, В.: Спорообразования бацилл. III. Переход кальция в клетки и снижение протеолитической активности среды в течение спорообразования у Bacillus megatherium 145
Вайсер, Я. и Лысенко, О.: Септикемия тутового шелкопряда . . . . . 216
Досталек, М. и Спурный, М.: Культивационные характеристики десульфурирующих бактерий нефтяных месторождений . . . . . 158
Дробник, Я.: Расщепление аспарагина энзиматическим комплексом почвы . . . . . 47
Дыр, И. и Противa, Ю.: Продукты обмена веществ в течение роста Clostridium acetobutylicum 151
Зайферт, Я.: Микробиологические процессы и каталитическая способность почвы . . . 74
Йогановский, Ю.: Состояние невосприимчивости в течение экспериментальной стафилококковой инфекции. I. . . . . 16
Йогановский, Ю.: Состояние невосприимчивости в течение экспериментальной стафилококковой инфекции. II. . . . . 111
Калина, Ч. и Падевет, М.: Новый способ окраски микробов . . . . . 184
Кокова-Кратохвилова, А., Гебауерова, А. и Грдинова, М.: Изучение эффекта Harden Young-а у дрожжей. I. . . . . 247
Малек, И.: Развитие чехословацкой микробиологии . . . . . 1
Марга, К. и Мюллер, Я.: Оценка кривых роста у Escherichia coli . . . . . 135
Мателова, В. и Нечасек, Я.: Влияние условий ферментации на продукцию пенициллина штаммом Penicillium chrysogenum 51—20 . . . . . 255
Ржегачек, З.: Определение количества спорообразующих актиномицетов в почве и их изоляция . . . . . 129
Ржегачек, З.: Распространение актиномицетов в зоне корней некоторых злаков в течение вегетации . . . . . 211
Ржига, И. и Ржигова, Л.: Влияние присутствия антител в культивационной среде на рост Salmonella paratyphi B . . . . . 59
Санто, Я.: Титрация вируса гриппа в тканевых культурах . . . . . 41
Санто, Я. и Валентова, Н.: Динамика размножения вируса гриппа в тканевых культурах во вращающихся пробирках . . . . . 227
Свобода, М. и Шалплахта, Я.: К вопросу очистки сточных вод заводов по переработке молока при помощи Oospora lactis . . . . . 176
Спурный, М., Досталек, М. и Улегла, Ю.: Метод количественного подсчета сульфатвосстаналивающих бактерий . . . . . 272
Старка, Ю. и Завада, Я.: Отношение метафосфата к образованию волютина у дрожжей 70
Трнка, З.: Влияние недостатка или избытка в пище белков на иммунную реакцию. I. Кратковременное действие диэты . . . . . 49
Трнка, З.: Влияние недостатка или избытка в пище белков на иммунную реакцию. II. Длительная диэта . . . . . 123
Улегла, Ю., Спурный, М. и Досталек, М.: Применение точечной реакции на сероводород при исследовании биологического восстановления сульфатов . . . . . 267
Халоупка, Ю.: Протеолитические энзимы актиномицета Streptomyces griseus. II. Влияние характера и концентрации азота на выделение протеазы . . . . . 32
Халоупка, Ю.: Протеолитические энзимы актиномицета Streptomyces griseus. III. Краткосрочная продукция энзима . . . . . 241
Шевчик, В., Подоил, М., Киселова, М. и Вртишкова, А.: Новый антибиотик BU 271 223
Шевчик, В., Подоил, М., Киселова, М. и Вртишкова, А.: Новый антибиотик BU 306 263
Шилганкова, Л.: Выробочное подавление R-форм дрожжей . . . . . 204
Штерцль, Я.: Длительная иммунизация. I. Торможение образования антител при ежедневной иммунизации . . . . . 7
Штерцль, Я.: Длительная иммунизация. II. Изменения в перитонеалном экссудате, в лейкоцитарной и температурной реакции . . . . . 165
Штерцль, Я. и Кралик, О.: Методика иммунизации с микроинтервалами . . . . . 139

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

CONTENTS

Beran K., Burger M.: A Study of Optimal Conditions for the Saccharification of Potato Mash by Fungoid Enzymatic Preparations . . . 97
Beran K., Burger M., Zelenka S.: New Findings in the Use of Amylolytic Preparations of Fungi for Saccharification of Starch in Potato Mash . . . 193
Borecký L.: Concerning the Question of Virus Receptors. The Elective Agglutinability of the Erythrocytes of the Ground Squirrel . . . 282
Burger M., Beran K.: On the Transglucósidational Activity of an Enzymatic Preparation of the Fungus Aspergillus niger . . . 26
Burger M., Rokos J., Procházka P.: The Influence of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase 105
Dostálek M., Spurný M.: Characteristics on Culturing of Sulphate Reducing Bacteria from Oil Deposits . . . 158
Drobník J.: Splitting of Asparagin by the Enzymatic Complex of Soils . . . 47
Dyr J., Protiva J.: Products of Metabolism during the Growth of Clostridium acetobutylicum . . 151
Chaloupka J.: Proteolytic Enzymes of Actinomyces Streptomyces griseus. II. The Influence of the Nature and Concentration of Nitrogen on the Secretion of Protease . . . 32
Chaloupka J.: Proteolytic Enzymes of the Actinomyces Streptomyces griseus. III. Short-term Production of the Enzyme . . . 241
Johanovský J.: The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection. I. . . . 16
Johanovský J.: The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection. II. . . . 111
Kalina Č., Padevět M.: A New Method of Staining Micro-organisms . . . 184
Kocková-Kratochvílová A., Gebauerová A., Hrdinová M.: Study of the Harden Young Effect in Yeasts. I. . . . 247
Málek I.: Development of the Czechoslovak Microbiology . . . 1
Marha K., Müller J.: An Evaluation of the Growth Curves of Escherichia coli . . . 135
Matelová V., Nečásek J.: The Significance of Fermentation Conditions for the Production of Penicillin by the Strain Penicillium chrysogenum 51—20 . . . 255
Řeháček Z.: Determination of the Number of Spores of Sporulating Actinomyces in the Soil and Their Isolation . . . 129
Řeháček Z.: Spreading of Actinomyces in the Rhizosphere of Some Grains . . . 211
Říha I., Říhová L.: The Influence of Antibodies in the Culture Medium on the Growth of Salmonella paratyphi B . . . 59
Seifert J.: Microbiological Processes and the Catalytic Power of Soil . . . 74
Spurný M., Dostálek M., Úlehla J.: A Method for Evaluating the Sulphate Reducing Bacteria . . 272
Stárka J., Závada J.: The Relationship between Metaphosphate and Volutin Formation in Yeast. Electrophoretic Separation of Phosphorylated Compounds Traced with $P^{32}$ . . . 70
Svoboda M., Šalplachta J.: Some Observations on the Cleansing of Dairy Sewage by Means of Oospora lactis . . . 176
Szántó J.: Titration of the Influenza Virus in Tissue Cultures . . . 41
Szántó J., Valentová N.: The Dynamics of Reproduction of the Influenza Virus in Tissue Cultures in Roller Tubes . . . 227
Ševčík V., Podojil M., Kyselová M., Vrtišková A.: The New Antibiotic BU 271 . . . 223
Ševčík V., Podojil M., Kyselová M., Vrtišková A.: The New Antibiotic BU 306 . . . 263
Šilhánková L.: Selective Inhibition of Rough Forms of Yeasts . . . 204
Šterzl J.: Long-term Immunisation. I. The Inhibition of Antibody Formation in Daily Immunisation 7
Šterzl J.: Long-term Immunisation. II. Changes in the Peritoneal Exsudate, Leucocytic and Temperature Reactions . . . 165
Šterzl J., Králík O.: A Method of Micro-interval Immunisation . . . 139
Trnka Z.: The Influence of Protein Deficiency and Excess in the Diet on Immunity Response. I. Short-term Administration of Diets . . . 49
Trnka Z.: The Influence of Protein Deficiency and Excess in the Diet on Immunity Response. II. Long-term Administration of Diets . . . 123
Úlehla J., Spurný M., Dostálek M.: Biological Sulphate Reduction as Studied by means of the Spot Test Reaction for Hydrogen Sulphide . . . 267
Vinter V.: Sporulation of Bacilli. II. Proteolytic Enzymes in the Process of Sporulation of Bacillus megatherium . . . 63
Vinter V.: Sporulation of Bacilli. III. Transference of Calcium to Cells and Decrease in Proteolytic Activity in the Medium in the Process of Sporulation of Bacillus megatherium . . . 145
Weiser J., Lysenko O.: Silk-worm Septicaemia . . . 216



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

## Upozornění čtenářům.

Redakce časopisu „British Abstracts of Medical Sciences" nás požádala, abychom upozornili čtenáře, že název tohoto časopisu byl změněn na

„International Abstracts of Biological Sciences".

Tato změna souvisí s tím, že bude rozšířen okruh biologických oborů, které jsou v časopise abstrahovány, a že tento časopis bude spolupracovat se sovětskými časopisy „Referativnyj žurnál biologii" a „Referativnyj žurnal biologičeskoj chimii". „International Abstracts of Biological Sciences" přináší abstrakty ze všech oborů biologie.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500006-9

**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-RDP80T00246A002900500006-9