Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
2

ČÍSLO
1

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, ÚNOR 1957 - STR. 1—64

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

Vedoucí redaktor: Akademik IVAN MÁLEK

Členové redakční rady:

Akademik DIONÝZ BLAŠKOVIČ, MIKULÁŠ BURGER, JOSEF DYR, MILOŠ HEROLD, CTIRAD JOHN, JAN KABELÍK, VÁCLAV KÁŠ, dopisující člen ČSAZV, JIŘÍ MÁLEK, JAROMÍR SEIFERT, JAROSLAV ŠTERZL

Členové redakčního kruhu:

KAREL BERAN, JIŘÍ MACURA, výkonný redaktor, ZDENĚK TRNKA

OBSAH

Šterzl J. : Tvorba protilátek isolovanými buňkami sleziny po smíšení s antigenem in vitro . . . 1

Hrubešová M.: Příspěvek k pokusům o tvorbu protilátek in vitro 10

Johanovský J.: Význam stafylokokového α toxinu a leukocidinu 15

Chaloupka J.: Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus*. IV. Vliv iontů na tvorbu enzymu 23

Bělík E., Herold M. a Doskočil J.: Nové způsoby biosyntetické výroby antibiotik. I. Biosyntesa chlortetracyklinu bez dodržení aseptických podmínek 30

Vondráčková J.: Význam přenosu kyslíku pro produkci antibiotik. I. Aplikace siřičitanové metody pro fermentace na třepacích strojích 37

Dostálek M., Štaud M. a Rosypalová A.: Působení mikroorganismů na naftové uhlovodíky . . . 43

Bystrický V.: K otázke štruktúry vírusu mozaiky tabaku 49

Ševčík V. a Kyselová M.: Zjišťování antimikrobního účinku antibiotik na agarových plotnách 53

Krátká původní sdělení

Šterzl J. a Trnka Z.: K otázce změny serového globulinu v protilátku pod vlivem antigenu . 57

Zprávy 59

Vychází šestkrát ročně * *Roční předplatné 39 Kčs* * *Jednotlivé číslo 6,50 Kčs*

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Tvorba protilátek isolovanými buňkami sleziny po smíšení s antigenem in vitro

JAROSLAV ŠTERZL

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 1. 9. 1956

Novější práce, v nichž byla sledována možnost tvorby protilátek na explantovaných tkáních, ke kterým byl přidán antigen in vitro, ukazují, že za těchto podmínek k tvorbě protilátek nedochází (Parker 1937, Salle a McOmie 1937, Selmar 1944, Fastier 1948). Positivní tvorbu protilátek v tkáňových kulturách je možno prokázat jen tehdy, je-li tkáň pro kultivaci odebrána ze zvířete imunisovaného in vivo (Mayer a Loewenthal 1927, Parker 1937, Fagraeusová 1948a, Ranney a London 1951, Thorbecke a Keuning 1953, Tanaka 1953, Stavitsky 1955, Askonas a Humphrey 1955). Tyto výsledky nasvědčovaly, jak také ve své práci uzavírá Parker (1937), že prvá fáze reakce na antigen se uskutečňuje jen v podmínkách celého organismu.

Domnívali jsme se, že přímou účast na tvorbě protilátek má nespecifická mobilisační reakce, která vzniká v organismu po vpravení antigenu. Ta se projevuje jak biochemickými a fysiologickými změnami (změnou hladiny cukru v krvi, teploty, počtu leukocytů atd.), tak i změnami morfologického charakteru mesenchymální tkáně (Fagraeusová 1948b, Marshal a White 1950, Makinodan a sp. 1954).

V této práci jsme chtěli řešit, do jaké míry je závislá tvorba protilátek na nespecifické metabolické a morfologické reakci organismu po injekci antigenu. Metabolické a morfologické změny jsme vyvolávali jiným antigenem (morčecím serem), po určité době (24 až 96 hodin) jsme odebrali slezinu, isolovali buňky sleziny a smíchali s antigenem (*Salmonella paratyphi* B) in vitro. Směs buněk sleziny a antigenu jsme přenášeli intraperitoneálně králičím mláďatům. Ta se již v dřívějších pokusech osvědčila pro přenos imunisovaných tkání, protože mláďata v raném údobí svého života neodpovídají na antigen tvorbou protilátek (Šterzl 1955). Stejným způsobem jsme postupovali i u kontrol, kde jsme smísili s antigenem slezinné buňky normálního, předem neimunisovaného zvířete.

Materiál a metody

Nespecifický antigenní podnět byl vyvolán morčecím serem, které jsme injikovali králíkům (2—3 kg) vždy 1 ml i. v. 24—96 hodin před usmrcením, jak je uvedeno u jednotlivých pokusů.

Slezinu imunisovaného i normálního králíka jsme po vynětí zpracovávali v komorové chladnici při 2 °C. Buňky jsme vytlačili ze slezinného pouzdra do vychlazeného fosfátfysiologického roztoku s 0,2 % želatiny. Jednotlivé buňky jsme uvolňovali opakovaným nassáváním do pipety. K dalšímu proprání, které jsme opakovali třikrát ve stejném roztoku, jsme oddělili pouze homogenní suspensi buněk. Konečného rozředění jsme dosáhli tak, že k 0,05 g slezinné tkáně jsme přidali 1 ml tekutiny

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

(suspense antigenu, u kontrol fysiologického roztoku). Počet buněk jsme v každém pokuse stanovili v Bürkerově komůrce; takto připravená suspense buněk obsahovala průměrně 30—40 × 10^6 buněk v 1 ml.

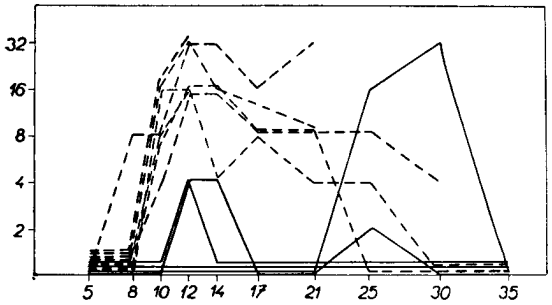
Jako antigenu jsme použili teplem zabité suspense mikrobů *S. paratyphi* B. Vzájemný kvantitativní poměr buněk sleziny a antigenu byl pro pokus jedním z rozhodujících činitelů a je uveden ve výsledcích. Směs buněk a antigenu jsme inkubovali společně při 37° a poté injikovali intraperitoneálně 1 ml 5 dní starým králíčatům. Čas společné inkubace byl u jednotlivých pokusů nestejný a je přesně uveden v popisu k obrázkům, ve většině pokusů byla doba smíšení 10 minut.

Časový sled odběrů krve u mláďat kardiální punkcí je rovněž patrný z obrázků. Sera jsme po odběru uchovávali při —15 °C a aglutinace u každé skupiny prováděli najednou. Kde bylo nezbytné odstranit lipoidní látky, byla sera vytřepána chloroformem. Aglutinace byly uloženy v lednici a odečítány po 4, 6 a 8 dnech.

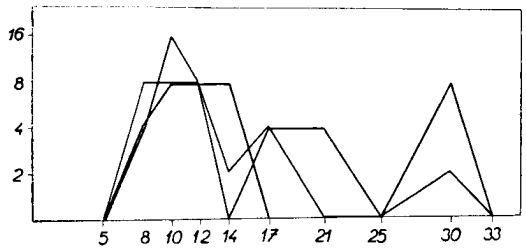
Buňky jsme ozařovali na misce uložené v ledu, kde byly ve vrstvě nepřesahující 1 mm. Ozařovali jsme přístrojem Mikrometa (AEG — 50-X-ray tube) za těchto podmínek: OK 10 cm, Al 0,1, KV 50, mA 6. Při těchto konstantách je ozáření 430 r za 10 vt.

Výsledky

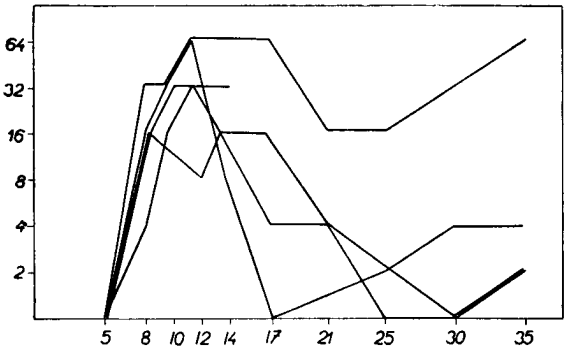
V prvých pokusech (Šterzl 1955), v nichž jsme přenášeli buňky normálního zvířete smíšené s antigenem intraperitoneálně králičím mláďatům, nezjistili jsme tvorbu



Obr. 1. Na 2 skupiny mláďat přeneseny slezinné buňky normálního králíka (40 × 10^6 buněk v 1 ml) smíšené 10 min. a) čárkovaně: s antigenem *S. paratyphi* B v koncentraci 100 × 10^6 mikrobů v ml; b) plně: s antigenem 500 × 10^6 mikrobů v ml. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.



Obr. 2. Isolované buňky ze sleziny (32 × 10^6 v 1 ml) králíka, imunisovaného 24 hodin předem 1 ml morčecího sera i. v. Buňky smíšeny in vitro s antigenem (10^8 mikrobů v ml) 10 min. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.

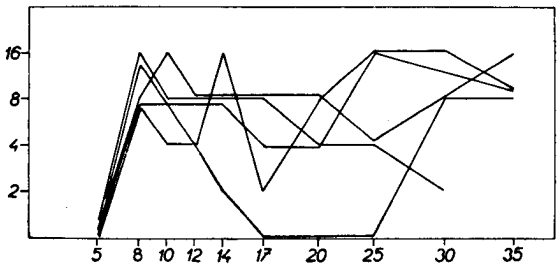


Obr. 3. Isolované buňky ze sleziny (41 × 10^6 v 1 ml) králíka, imunisovaného před 72 hodinami 1 ml morčecího sera i. v., inkubovány in vitro s antigenem (10^8 mikrobů v ml) 10 min. a přeneseny intraperitonálně skupině králíčat. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.

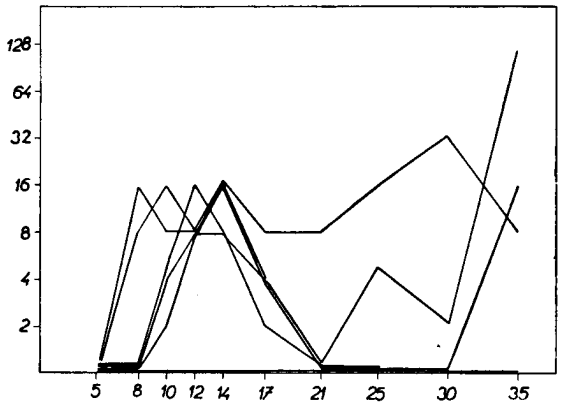
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

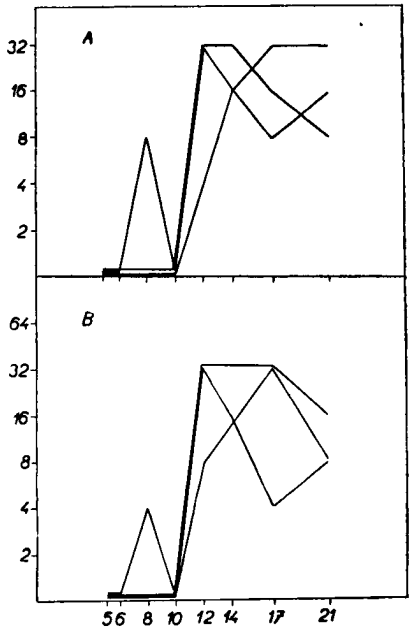
protilátek. Množství antigenu, použité v těchto pokusech, bylo 10^9 bakterijních buněk v 1 ml.*) Když jsme později snížili množství antigenu, přidávaného k buňkám in vitro, zjistili jsme po přenosu na mláďata průkaznou tvorbu protilátek. Proto jsme nejprve hledali optimální vztah mezi antigenem a buňkami. Dosavadní výsledky ukazují, že nejvhodnější poměr mezi buňkami sleziny a antigenem je 1—2 mikroby na jednu slezinnou buňku. Vyšší koncentrace antigenu tvorbu protilátek potlačují (obr. 1).



Obr. 4. Ze sleziny králíka č. 43, který byl v průběhu 14 dní imunisován 5 dávkami 1 ml morčecího sera i. v., byly isolovány slezinné buňky (35 × 10^6 v 1 ml). Smíšeny in vitro 10 min. s antigenem (10^8 mikrobů v 1 ml) a po inkubaci přeneseny intraperitoneálně skupině králíčat. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.



Obr. 6. Isolované buňky z normálního králíka (44 × 10^6 v 1 ml) byly smíšeny s antigenem (10^8 v ml) 10 minut. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.



Obr. 5. Isolované slezinné buňky (45 × × 10^6 v 1 ml) ze dvou králíků, kteří byli 72 hodiny předem imunisováni i. v. 1 ml antigenu *S. paratyphi* B (10^8 mikrobů). Mláďatům přenesena polovina buněk: A. pouze propraných ve fysiologickém roztoku; B. po proprání inkubovaných s antigenem 30 min. (10^8 mikrobů v 1 ml). Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.

Zjišťovali jsme tvorbu protilátek po smíšení antigenu (*S. paratyphi* B) se slezinnými buňkami, isolovanými ze zvířat po nespecifické stimulaci morčecím serem. Pokusy byly provedeny na 60 zvířatech v deseti vrzích mláďat. U všech skupin, kterým byl dán antigenní podnět cizorodým serem 24—96 hodin před vynětím sleziny a poté buňky sleziny smíchány in vitro s antigenem (*S. paratyphi* B), jsme zjistili u mláďat protilátky aglutinující specifický antigen již během několika dní po intraperitoneálním přenosu mláďatům (obr. 2, 3). Nezjistili jsme podstatné

*) Čs. biologie 4: 321, 1955 je nesprávně uvedeno 10^7 mikrobů.

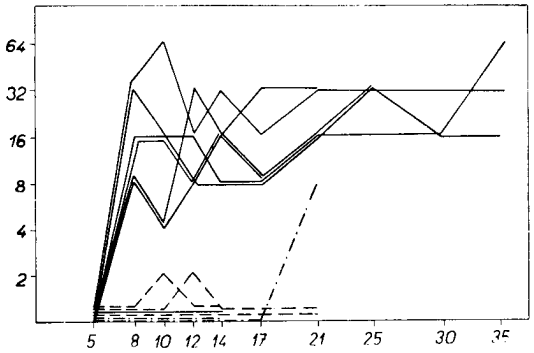
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

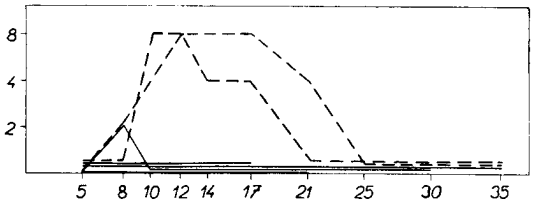
zvětšení tvorby protilátek ani tehdy, když jsme isolovali buňky ze sleziny zvířete, imunisovaného během 14 dní pěti dávkami morčecího sera (obr. 4). Toto zjištění je zajímavé proto, že po nespecifické imunisaci docházelo ve všech pokusech již v průběhu prvých dní ve slezinné tkáni ke stále význačnější reakci morfologické, ke zvyšování počtu retikulárních buněk, plasmoblastů, plasmocytů a přechodnému snížení počtu lymfocytů (Holub 1957). Tvorbu protilátek jsme prokázali i v pokusech, v nichž jsme isolovali slezinné buňky z organismu imunisovaného in vivo specifickým antigenem (*S. paratyphi* B) a smíchali s tímto antigenem buňky in vitro (obr. 5).

V dalších pokusech, které jsme konali na osmi skupinách s 65 mláďaty, jsme přenášeli na mláďata slezinné buňky normálních zvířat, smíšené in vitro s optimálním množstvím antigenu. I ve všech těchto pokusech jsme u mláďat zjistili tvorbu aglutinujících protilátek (obr. 6).

Protože stejně připravené buňky sleziny, smíšené s optimálním množstvím antigenu a kultivované v tkáňových kulturách, netvořily protilátky (Rychlíková a Šterzl 1957), bylo nutno uvažovat, zda se králičí mláďata aktivně neúčastní tvorby protilátek. Prokázali jsme však přenosem na 8 skupin, celkem 55 mláďat, že ozáříme-li isolované buňky, vytvářejí se protilátky pouze u těch zvířat, kterým byly přeneseny buňky nepoškozené ozářením. Buňky, které dále vytvářejí protilátky, jsou buď ozářeny malými dávkami (obr. 7), nebo neozářené (obr. 8). Dávka 1000 a 1200 r již zcela utlumuje tvorbu protilátek.



Obr. 7. Isolované buňky z normálního králíka (39 × × 10^6 v 1 ml) byly ozářeny dávkou 869 r (plně), 1000 r (čárkovaně) a 1200 r (čerchovaně) a poté smíšeny s antigenem (10^8 mikrobů v 1 ml) 10 min. a injikovány i. p. králíčatům. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve osa y: titr aglutinačních protilátek.



Obr. 8. Isolované buňky ze sleziny (43 × 10^6 v 1 ml), z nichž polovina byla neozářena (čárkovaně), polovina ozářena dávkou 1200 r (plně), byly po 4 hodinách inkubace při 37 °C smíšeny s antigenem 10^8 mikrobů a injikovány mláďatům i. p.

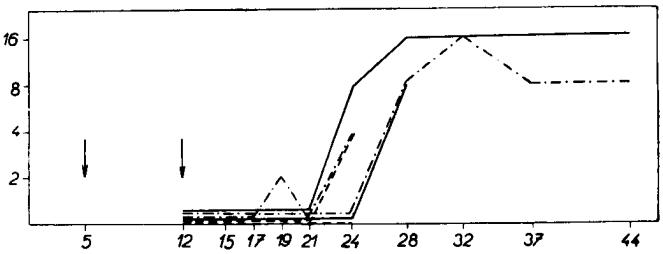
Aktivní spoluúčast mláďat v tvorbě protilátek nepodporují dále tato zjištění: po přenosu buněk dochází k prvé fázi, rychlému vzniku protilátek po přenosu, kterou lze potlačit ozářením buněk. Druhá fáze protilátkové reakce je aktivní odpověď mláďat na antigen, přenášený současně s buňkami, a je časově shodná se vznikem protilátek, byl-li mláďatům vpraven pouze antigen (20. až 30. den života). Nejde tedy přenosem buněk s antigenem o indukci aktivní odpovědi u mláďat na antigen, protože potom vlastní aktivní tvorba protilátek by musela nastoupit již krátce po přenosu buněk. Neukazuje se ani, že vpravení cizorodého antigenu by urychlovalo u mláděte aktivní odpověď na antigen. To dokládá pokus, kdy jsme nejprve injikovali jiný antigen (morčecí serum) a 7 dní potom antigen *S. paratyphi* B. Tvorba protilátek se po tomto zásahu ve srovnání s kontrolami nijak neurychlila (obr. 9). Souhrnně posuzujeme organismus mláďat, na který přenášíme slezinné buňky s antigenem jako pasivní,

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

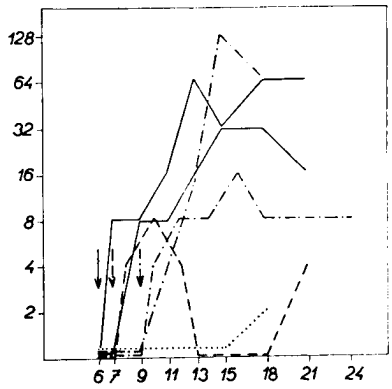
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

jako vhodné kultivační prostředí umožňující rozvoj přenesených buněk i jejich složitých biochemických procesů zúčastněných při tvorbě protilátek.

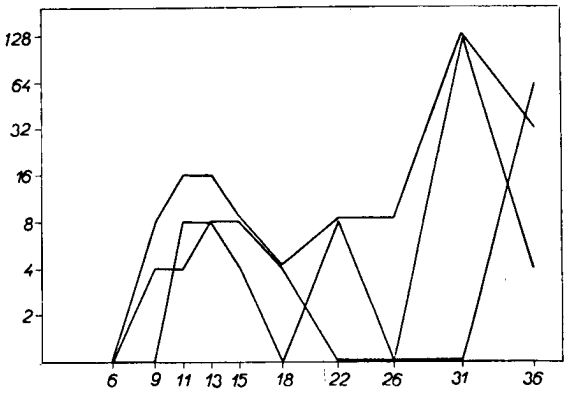
Dále bylo třeba stanovit, zda v průběhu krátkodobé inkubace antigenu s buňkami in vitro dochází k aktivním pochodům v slezinných buňkách. Je možné, že antigen



Obr. 9. Ze skupiny šesti mláďat bylo čtyřem injikováno pátý den života morčecí serum; čerchovaně: 2 ml morčecího sera i. p.; čárkovaně: 3 ml morčecího sera; plně: kontroly bez sera. 12. den života byl injikován intrakardiálně antigen (10^8 mikrobů v 1 ml). Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.



Obr. 10. Isolované buňky ze sleziny (28×10^6 v 1 ml) byly injikovány intraperitoneálně králičím mláďatům. Plně: buňky smíchány okamžitě s 1 ml antigenu; čárkovaně: 1 ml antigenu injikován i. p. 24 hodin po injekci buněk sleziny; čerchovaně: 1 ml antigenu injikován i. p. 72 hodiny po vpravení buněk sleziny; tečkovaně: buňky sleziny zabity zahřátím na 56 °C po dobu 30 min. a po smíchání s antigenem injikovány králíčatům. Koncentrace antigenu: v 1 ml 10^8 mikrobů. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.



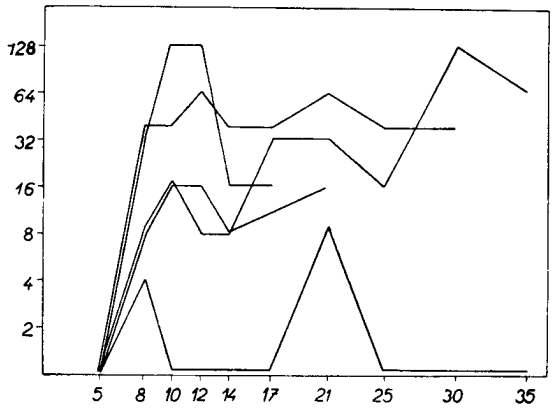
Obr. 11. Isolované buňky ze sleziny králíka, kterému bylo 72 hodiny předtím injikováno morčecí serum. Buňky po proprání suspendovány ve fysiologickém roztoku (35×10^6 buněk v 1 ml) a 1 ml injikován intraperitoneálně. Poté injikován antigen (10^8 mikrobů) do krevního oběhu intrakardiálně. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.

a slezinné buňky pouze přenášíme do vhodného prostředí, vlastní reakce tvorby protilátek že se uskutečňuje teprve v mláděti. Této možnosti by nasvědčovalo i to, že pokud jsme injikovali mláďatům slezinné buňky normálního dospělého králíka a teprve poté za 24, 48 i 72 hodiny jsme intraperitoneálně injikovali antigen, i tehdy došlo k protilátkové reakci (obr. 10). To svědčí o tom, že přenášené buňky sleziny v mláděti přežívají a že kontakt antigenu s nimi je možný i in vivo. Tvorbu protilátek jsme prokázali i v případě, kdy nejprve injikujeme intraperitoneálně slezinné buňky a antigen poté vpravujeme do krevního oběhu intrakardiálně (obr. 11). Tento pokus nasvědčuje tomu, že buňky přenesené do peritonea se nelokalisují pouze místně, ale že se dostávají i do vnitřních orgánů mláděte, jak byl dán přímý důkaz Holubem (1957).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Význam období, v kterém jsou buňky s antigenem ve styku in vitro, jsme se snažili prokázat tím, že jsme vymývali antigen po inkubaci s buňkami in vitro. V těchto pokusech byl přenos uskutečněn na 4 skupiny mláďat, celkem 21 zvířat. Ukázalo se, že vymytím přebytečného antigenu se nezrušila schopnost přenesených buněk tvořit protilátky (obr. 12). Množství antigenu zbylé v buňkách jsme po rozrušení buněk mrazením a táním stanovili imunisací dospělých zvířat. Množství antigenu



Obr. 12. Buňky sleziny isolované z normálního králíka (39 × 10^6 buněk v 1 ml) byly inkubovány společně s antigenem (10^8 mikrobů v 1 ml) 2 hodiny při 37 °C. Po inkubaci vymyt přebytečný antigen želatinovým fysiologickém roztokem a buňky injikovány (1 ml) i. p. skupině králíčat. Část buněk rozrušena mrazením a táním pro stanovení množství antigenu v buňkách. Osa x: stáří králíčat ve dnech, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr aglutinačních protilátek.

přidávané k buňkám (10^8 mikrobů) dává u dospělých králíků průměrně titr protilátek 1 : 512—1024. Po imunisaci rozrušenými buňkami titr protilátek u králíků byl v průměru 1 : 32—64. Na 2 skupiny (13 mláďat) jsme přenesli buňky, z nichž polovina byla inkubována s antigenem v thermostatu, polovina v lednici. Po inkubaci jsme buňky proprali a zjistili jsme, že buňky inkubované s antigenem v lednici netvoří protilátky. I když z těchto pokusů není možno uzavírat, že se již in vitro uskutečňují začáteční biochemické procesy tvorby protilátek, je možno výsledky posuzovat tak, že in vitro dochází buňkami k vazbě účinného množství antigenu, které je jenom částí celkově přidaného množství.

Diskuse

Tvorby protilátek na isolovaných buňkách jsme dosáhli tak, že jsme smísili v optimálním poměru slezinné buňky s antigenem in vitro a po inkubaci jsme je přenesli intraperitoneálně králičím mláďatům. V době, kdy jsme prvně referovali o úspěšné tvorbě protilátek isolovanými buňkami sleziny (Šterzl a Hrubešová 1955b), byla publikována obsáhlá práce Harrise a sp. (1955), které předcházelo (1954) předběžné sdělení. V jejich pokusech se podařilo dosáhnout tvorby protilátek na isolovaných buňkách lymfatických uzlin po smíchání s antigenem a přenosem na zvířata ozářená paprsky *X*. I když je použito jiného experimentálního modelu i jiného antigenu, zásadní výsledky jsou shodné. Naopak Roberts a Dixon (1955) neprokázali protilátky smíšením buněk s antigenem in vitro a přenosem směsi na zvířata ozářená *X*-paprsky. Positivní výsledky přenosu měli pouze tehdy, byla-li zvířata imunisována již in vivo. Naše výsledky jejich nálezy nepotvrzují. Domníváme se, že hlavním důvodem jejich negativních výsledků je použitý bílkovinný antigen, protože vytvořené protilátky lze precipitací dokázat málo citlivě.

Hlavní otázka je, zda tvorba protilátek při přenosu buněk s antigenem na mláďata není způsobena aktivní reakcí příjemců. Ukázali jsme, že porušením životních pochodů přenášených buněk — na př. ozářením — se možnost tvorby protilátek

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

po přenosu na mláďata ruší. Nelze tím ovšem vyloučit možnost, že ozářením se porušují i struktury buněk (na př. mitochondrie), které přeneseny na mláďata indukují u nich změnu metabolického stavu, umožňující aktivní reakci mláďat na přenesený antigen. Tuto možnost však nepodporují další zjištění. Protilátky se vytvářejí po přenosu buněk ve dvou časově oddělených obdobích. Prvé je závislé na funkci přenesených slezinných buněk, druhé je vlastní aktivní odpověď mláděte na antigen současně s buňkami injikovaný. V experimentální části jsme ukázali na to, že aktivní odpověď není nijak urychlena proti tomu, je-li vpraven mláďatům pouze antigen. Kdyby došlo k indukci metabolického stavu, který by umožňoval mláďatům reakci na antigen, potom bychom již jako prvou odpověď stanovili dlouho přetrvávající hladinu protilátek, charakteristickou pro aktivní tvorbu, nikoliv typickou křivku pasivního přenosu. Účast mladého organismu posuzujeme v celé reakci jako pasivní, pouze jako vhodné prostředí pro udržení životaschopnosti přenesených buněk a biochemických pochodů, nezbytných v procesu tvorby protilátek.

Z těchto výsledků uzavíráme, i když se nám s Rychlíkovou (1957) nepodařilo v tkáňových kulturách prokázat tvorbu protilátek, že hlavní rozdíl proti přenosům na králičí mláďata jsou nedostatečné podmínky výživy buněk v tkáňových kulturách. Jsme přesvědčeni, že zlepšením kultivačního prostředí v tkáňových kulturách dosáhneme stejného výsledku jako při přenosu na mláďata, t. j. tvorby protilátek.

Je třeba vyjasnit, proč tvorba protilátek přenesenými buňkami poměrně krátce přetrvává. Je možné, že další generace buněk, které se s antigenem nesetkaly, protilátky nevytvářejí a metabolická změna (produkce protilátek) se dalšími generacemi buněk již nedědí. Stejně je třeba v této souvislosti uvažovat, že může jít o projev transplantační imunitní odpovědi příjemce. Podstatu tohoto jevu řešíme dalšími pokusy.

Zjištění možnosti tvorby protilátek za vhodných podmínek isolovanými buňkami dává odpověď na řadu otázek. Je tak vymezen význam neurohumorálních činitelů, především jako vytváření nejvhodnějších metabolických podmínek prostředí i metabolické úrovně buněk. Naopak se těmito pokusy vylučuje přímá kausální účast nervových a jiných činitelů při tvorbě protilátek. Tyto pokusy jsou i experimentální odpovědí na současné diskuse o významu reflexních pochodů pro tvorbu protilátek. Zjištění tvorby protilátek na isolovaných buňkách umožňuje soustředit pozornost na tu etapu jejich vzniku, kdy dosud nejsou serologicky prokazatelné protilátky ani v buňkách, ani v seru. Tuto cestu nastupujeme sledováním metabolických změn po styku antigenu a buněk, sledováním vlivu antimetabolitů a záření na protilátkovou reakci na buněčné úrovni. Současně vzniká i otázka, zda bude možno dosáhnout tvorby protilátek i po smíšení buněčných částic s antigenem in vitro. To proto, že jsme tvorbu protilátek přenesli z imunisovaných zvířat na králičí mláďata isolovanými mitochondriemi (Šterzl a Hrubešová 1955a).

Souhrn

Buňky isolované ze sleziny dospělého králíka a smíšené s antigenem in vitro (*S. paratyphi* B) vytvářejí protilátky, jsou-li injikovány intraperitoneálně 5 dní starým králíčatům. V tomto stáří nereagují králíčata na přenesený antigen tvorbou protilátek.

Nebyly zjištěny rozdíly v intensitě tvorby, byly-li mláďatům přeneseny po smíšení s antigenem buňky normálního králíka, buňky ze sleziny králíka imunisovaného nespecifickým antigenem (morčecím serem) nebo specifickým antigenem (*S. paratyphi* B).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Tvorbu protilátek umožňuje optimální kvantitativní vztah při smíšení buněk a antigenu in vitro. U korpuskulárního antigenu přidáváme na jednu buňku sleziny 2 mikroby *S. paratyphi* B. Větší dávky antigenu tvorbu protilátek utlumují.

Ozáříme-li isolované buňky 860 r, neutlumuje se tvorba protilátek, ozáření buněk 1000—1200 r tvorbu protilátek ruší. Přenesené slezinné buňky dospělého králíka neindukují aktivní odpověď na antigen u mláďat. Posuzujeme účast příjemce (mláděte) na tvorbě protilátek jako pasivní, jako vhodné kultivační prostředí pro přenesené buňky.

Buňky, vpravené do organismu, přežívají: tvorbu protilátek je možno vyvolat injekcí antigenu mláďatům 24 i 72 hodiny po vpravení pouze propraných slezinných buněk. Protilátky se vytvářejí i tehdy, jsou-li injikovány buňky i. p. a antigen do krevního oběhu.

Při smíšení buněk s antigenem v teplotě 37 °C dochází k rychlé vazbě účinného množství antigenu buňkami. Vyprání zbylého antigenu po inkubaci neruší tvorbu protilátek.

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

Literatura

Askonas, B. A., Humprey, J. H.: *Antibody formation in slices of granulomata produced by adjuvant.* Biochem. J. 60 : X, 1955.

Fagraeus, A.: *The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro.* J. Immunol. 58 : 1, 1948a.

Fagraeus, A.: *Antibody production in relation to the development of plasma cells.* Acta med. scand. suppl. 204, 1948b.

Fastier, L. B.: *An attempt to produce bacterial agglutinins in vitro.* J. Immunol. 60 : 399, 1948.

Harris, T. N., Harris, S., Farber, M. B.: *Transfer to X-irradiated rabbits of lymph node cells incubated in vitro with Shigella paradysenteriae.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86 : 549, 1954.

Harris, S., Harris, F. N.: *Studies on the transfer of lymph node cells. V. Transfer of cells incubated in vitro with suspensions of Shigella paradysenteriae.* J. Immunol. 74 : 318, 1955.

Holub, M.: *Kvantitativní změny lymfatické tkáně během imunisace.* Čs. morfologie 1957, v tisku.

Makinodan, T., Ruth, R. F., Wolfe, H. R.: *Precipitin production in chickens. X. Cellular changes in the spleen during antibody production.* J. Immunol. 72 : 39, 1954.

Marshall, A. H. E., White, R. G.: *Reaction of the reticular tissues to antigens.* Brit. J. Exp. Pathol. 31 : 157, 1950.

Meyer, K., Loewenthal, H.: *Untersuchungen über Anaphylaxie an Gewebekulturen.* Zschr. Immunitätsforsch. 54 : 420, 1927.

Parker, R. C.: *Studies on the production of antibodies in vitro.* Science 85 : 292, 1937.

Ranney, H. M., London, M.: *Antibody formation in surviving tissues.* Fed. Proc. 10 : 562, 1951.

Roberts, J. C., Dixon, J. F.: *The transfer of lymph node cells in the study of the immune response to foreign proteins.* J. Exp. Med. 102 : 379, 1955.

Rychlíková, M., Šterzl, J.: *Pokusy o tvorbu protilátek v tkáňové kultuře.* Čs. biologie, 1957, v tisku.

Salle, A. J., McOmie, W. A.: *Immunological responses of tissues cultivated in vitro.* J. Immunol. 32 : 157, 1937.

Selmar, E.: *On the formation of bacterial antibodies in tissue cultures.* Acta pathol. microbiol. scand. 21 : 517, 1944.

Stavitsky, A. B.: *In vitro production of diphtheria antitoxin by tissues of immunized animals. I. Procedure and evidence for general nature of phenomenon.* J. Immunol. 75 : 214, 1955.

Šterzl, J.: *Průkaz a biologické vlastnosti prekursoru serových protilátek.* Čs. biologie 4 : 321, 1955.

Šterzl, J., Hrubešová, M.: *Přenos tvorby protilátek nukleoproteidovými frakcemi na neimunisované příjemce.* Čs. biologie 4 : 600, 1955.

Šterzl, J., Hrubešová, M.: *Tvorba protilátek — model adaptivní proteosynthesy.* Sjezd o bílkovinách 1. 12. 1955. Čs. gastroenterol. 10 : 228, 1956.

Tanaka, N.: *Studies of antibody producing cells. II. The agglutinin formation in the bone—marrow of rabbits.* Jap. J. Bact. 8 : 193, 1953.

Thorbecke, G. J., Keuning, F. J.: *Antibody formation in vitro by haemopoietic organs after subcutaneous and intravenous immunization.* J. Immunol. 70 : 129, 1953.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Образование антител изолированными клетками селезенки после их смешивания с антигеном in vitro

Я. Штерцль

Резюме

Клетки, выделенные из селезенки взрослого кролика и смешанные in vitro с антигеном (S. paratyphi B), образуют антитела при впрыскивании в полость брюшины 5-дневным крольчатам. В этом возрасте крольчата не реагируют на введение антигена образованием антител. В интенсивности образования антител не было разницы, если крольчатам вводились смешанные с антигеном: клетки нормального кролика, клетки селезенки кролика, иммунизированного неспецифическим антигеном (сыворотка морской свинки) или специфическим антигеном (S. paratyphi B). Образование антител обусловлено оптимальными количественными соотношениями в смеси клеток с антигеном in vitro. У корпускулярного антигена мы на 1 клетку селезенки прибавляем 2 микробов S. paratyphi B. Более крупные дозы антигена подавляют образование антител. Если облучить изолированные клетки дозой в 860 r, образование антител не нарушается, однако облучение клеток дозой в 1000—1200 r подавляет образование антител. Перенесение клеток селезенки взрослого кролика не индуцирует у крольчат активного ответа на антиген. Мы рассматриваем участие реципиента (молодого кролика) в образовании антител как пассивное, — как участие благоприятной культивационной среды для трансплантируемых клеток. Вводимые в организм клетки выживают: образование антител можно вызвать путем впрыскивания крольчатам антигена через 24 и 72 часа после введения просто промытых клеток селезенки. Антитела образуются и тогда, если клетки вводятся в полость брюшины, а антиген — в кровяное русло. При смешивании клеток с антигеном при 37°C происходит быстрое связывание клетками эффективного количества антигена. Отмывание остатков антигена после инкубации не нарушает образования антител.

The Formation of Antibodies by Isolated Spleen Cells after Admixture with an Antigen in vitro

J. Šterzl

Summary

Cells isolated from the spleen of an adult rabbit and mixed with an antigen in vitro (S. paratyphi B) form antibodies when injected intraperitonealy in five-day-old rabbits. At this age, young rabbits do not react to a transferred antigen by the formation of antibodies. No difference was found in the degree of antibody formation on the injection of cells from a normal rabbit, mixed with the antigen, cells from the spleen of a rabbit immunized with a non-specific antigen (guinea-pig serum) or cells immunized with a specific antigen (S. paratyphi B). Antibody formation is made possible by an optimal quantitative relationship when mixing the cells and the antigen in vitro. In a corpuscular antigen, two micro-organisms of S. paratyphi B are added to one spleen cell. Large doses of the antigen depress the formation of antibodies. If isolated cells are irradiated with a dose 860 r, antibody formation is not depressed, whereas irradiation of cells with 1000—1200 r completely stops the formation of antibodies. The transfer of spleen cells from an adult rabbit does not induce an active response to the antigen in young rabbits. The participation of the recipient (the young rabbit) in antibody formation is regarded as passive, as a suitable medium for the transfer of cells. Cells injected into an organism survive; antibody formation can be induced by injecting the young animals with the antigen 24 and 72 hours after the injection of plain washed spleen cells. Antibodies are formed, therefore, following the intraperitoneal injection of cells and injection of the antigen into the blood stream. On mixing the cells with the antigen at a temperature of 37° C, the effective amount of antigen rapidly becomes bound by the cells. Washing of the remaining antigen following incubation does not stop antibody formation.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Příspěvek k pokusům o tvorbu protilátek in vitro

MIROSLAVA HRUBEŠOVÁ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 12. 1. 1956

Při řešení problému tvorby protilátek jsme považovaly za nutné si ověřit, zda je možné získat za laboratorních podmínek bez účasti živého organismu anebo tkáně vlivem antigenu protilátku z γ-globulinu normálního sera.

Z prací, které se věnovaly otázce tvorby protilátek in vitro, nás zaujaly výsledky Paulingovy a Campbellovy (1942), kteří uvádějí, že se jim podařilo specificky pozměnit bílkovinu (γ-globulin hovězího sera) vlivem antigenu (barviv, polysacharidu) tak, že dávala serologickou reakci protilátky. O reprodukci těchto pokusů se pokusili Kuzin a Nevreva (1947); zjistili, že vlivem methylové modře dochází sice ke změně malé části bílkoviny, která získává schopnost tvořit s barvivem nerozpustné precipitáty, avšak s bakterijním polysacharidem *(Shigella dysenteriae, Shigella paradysenteriae)* nepotvrzují vznik volné protilátky in vitro za podmínek pokusů. Současně při reprodukci pokusů Baconových (1943) s difterickým toxinem a dehydratovanou bílkovinou pozorovali pouze inaktivaci toxinu, ne však vznik antitoxinu.

Při svých pokusech o tvorbu protilátek in vitro jsme používaly jako antigenu specifického polysacharidu pneumokoka III, arabské gumy, která je blízká chemickou povahou specifickému polysacharidu, a jako bílkoviny γ-globulinu, isolovaného z normálního králičího sera.

Materiál a metody

Příprava γ-globulinu. γ-globulin jsme připravovaly alkoholickou frakcionací (Cohn a sp. 1940) králičího sera normálního a antipneumokokového (proti typu III) anebo kombinací metod alkoholické frakcionace a srážení rivanolem (Hořejší a Smetana 1954). Čerstvé serum jsme vychladily na 0 °C a srážely stejným objemem 50% alkoholu vychlazeného na −5 °C v alkoholické lázni při −5 °C. Získanou frakci II + III jsme odstředily při −5 °C a rozpustily v původním objemu fysiologického roztoku, vychlazeného na 0°. Takto získaný roztok jsme zpracovaly dále rivanolem, sraženinu odstředily, roztok odbarvily aktivním uhlím a čistý γ-globulin vysušily mrazovou sublimací. Získaný preparát jsme kontrolovaly elektroforesou na papíře.

Příprava specifického polysacharidu pneumokoka III. Fosfátový bujon jsme naočkovaly virulentním kmenem pneumokoka III a inkubovaly 72 hodiny při 37 °C. Pak jsme přidaly 1 % fenolu a bujon vakuově zahustily. Po opakovaném alkoholickém srážení a po odstranění veškerých bílkovin a příměsí glykogenu jsme polysacharid vysušily v exikátoru za vakua a analysovaly (Heidelberger a sp. 1936); získaný přípravek vyhovoval požadavkům na čistotu.

Příprava polysacharidu z Klebsiella rhinoscleromatis. Použily jsme postupu, vypracovaného pro přípravu specifického polysacharidu z pneumokoka III (Heidelberger a sp. 1936) s tím rozdílem, že jsme upustily od srážení octanem měďnatým a čistily polysacharid, zbavený bílkovin, srážením alkoholem.

Arabská guma. Používaly jsme obchodního přípravku, který jsme přečistily srážením alkoholem.

Imunisace. Králíky průměrné váhy 3—4 kg jsme dlouhodobě imunisovaly kombinovanou standardní a vždy čerstvě připravenou slizovitou suspensí pneumokoka III (Kaufmann a sp. 1938).

Sledování reakce antigenu s protilátkou. Vzorky jsme vyhodnocovaly precipitačním a aglutinačním testem, dále mikroprecipitační metodou, kombinovanou s kolorimetrickým měřením (Krueger a Hei-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

delberger 1951). Souběžně jsme prováděly kontroly s normálním a antipneumokokovým serem proti typu III s příslušnými antigeny a s kontrolními antigeny, polysacharidem *Klebsiella rhinoscleromatis* a pneumokokem VIII.

Obsah bílkoviny ve vzorcích jsme sledovaly v 5 ml Brdičkovy kobaltité soluce [0,001 M $Co(NH_3)_6Cl_3$, 0,1 M NH_4Cl, 0,1 M nebo 2 M NH_3] polarograficky a zároveň zjišťovaly specifické snížení výšky bílkovinné vlny vlivem příslušného antigenu. Kontroly jsme prováděly jednak s roztoky γ-globulinu z normálního a antipneumokokového sera a antidifterického globulinu různé koncentrace, jednak s normálním a antipneumokokovým serem.

Pracovní postup. Vzorky obsahující 50—250 mg γ-globulinu a 50—250 mg příslušného antigenu jsme rozpustily v sterilním fysiologickém roztoku tak, aby výsledná koncentrace γ-globulinu v roztoku byla 1%; pH upravily případně na 7,5. Roztok jsme ponechaly v sterilních nádobkách, uzátkovaných gumovou zátkou obalenou celofánem, 14 dnů v termostatu při 57 °C. Zároveň byly nasazeny kontroly obsahující jednak 50—250 mg γ-globulinu bez antigenu, jednak 50—250 mg samotného antigenu (tab. 1).

Sraženinu vzniklou během čtrnáctidenního zahřívání jsme po vynětí vzorků odstředily za chladu při +2 °C, opakovaně promývaly fysiologickým roztokem, odstředily a dále zpracovávaly trojím způsobem, abychom uvolnily případně vzniklou protilátku.

Odstředěnou a promytou sraženinu jsme rozpouštěly v 15% roztoku chloridu sodného, ke kterému jsme pak přidávaly kyselinu solnou do pH 4, abychom odstranily srážením polysacharid. Po odstředění jsme čirý roztok, obsahující bílkovinu, případně protilátku, dialysovaly proti fysiologickému roztoku při +2 °C a upravily pH na 7. Vzorek jsme vysušily mrazovou sublimací a k dalším testům používaly rozpuštěný v destilované vodě.

Při druhém způsobu jsme po rozpuštění sraženiny 15% roztokem chloridu sodného odstraňovaly polysacharid srážením chloridem vápenatým. V případech, kdy u vzorků nevznikla po čtrnáctidenní inkubaci sraženina, jsme roztok sytily pevným chloridem sodným až do 15% koncentrace a pak odstraňovaly polysacharid z roztoku chloridem vápenatým. Po odstředění v obou případech jsme dialysovaly čirý roztok, obsahující bílkovinu, proti fysiologickému roztoku při +2 °C.

Kromě toho jsme použily metody vypracované pro čištění protilátek (Kabat, Mayer a Heidelberger 1948). Sraženinu jsme extrahovaly 15% roztokem chloridu sodného jednu hodinu při 37°. Nerozpuštěný zbytek jsme odstředily a uschovaly pro další zpracování. Extrakty jsme dialysovaly při +2 °C proti fysiologickému roztoku. Sraženinu vzniklou při dialyse jsme odstředěním odstranily a bílkovinu, případně protilátku, obsaženou v roztoku, jsme vysušily mrazovou sublimací. Vzorky k testům jsme rozpouštěly v destilované vodě. Nerozpuštěný zbytek po extrakci 15% roztokem chloridu sodného jsme promyly vodou, odstředily, suspendovaly znovu ve vodě a rozpouštěly přidáváním nasyceného roztoku hydroxydu barnatého a opětovně srážely 10% roztokem chloridu barnatého. Po neutralisaci kyselinou octovou a odstředění sraženiny jsme dialysovaly roztok, obsahující případně protilátku, proti fysiologickému roztoku za chladu, až dialysát nedával reakci na baryum. Obsah dialysační trubice jsme vysušily mrazovou sublimací. Vzorky k testům jsme rozpouštěly v destilované vodě.

Výsledky a diskuse

V pokusech, v nichž jsme sledovaly tvorbu protilátek in vitro (tab. 1), jsme pozorovaly, že u většiny vzorků, obsahujících globulin ať normálního sera či antisera, se vytvořila během čtrnáctidenního zahřívání při 57 °C v termostatu ssedlina. Rozpustnost ssedlin při dalším zpracování byla malá na rozdíl od rozpustnosti pravých serologických precipitátů za stejných podmínek. Polarograficky jsme zjistily, že větší část množství bílkoviny dané do pokusu je v tekutině nad ssedlinou.

Jak je vidět z tabulky, nezískala u vzorků γ-globulinu a arabské gumy ani bílkovina v roztoku, ani bílkovina isolovaná z vytvořené ssedliny schopnost tvořit s čerstvě přidaným antigenem specifický precipitát.

U vzorků, kde byl ke γ-globulinu normálního sera přidán jako antigen polysacharid pneumokoka III, jsme nezjistily v tekutině nad ssedlinou na rozdíl od údajů Paulingových a Campbellových (1942) specificky pozměněnou bílkovinu ani aglutinačním ani precipitačním testem.

Extrakcí sraženiny 15% roztokem chloridu sodného jsme v jediném případě ze všech pokusů získaly přípravek, jehož roztok se při mikroprecipitačním testu s polysacharidem pneumokoka III po 4 dnech uchovávání za chladu (+2 °C) zakalil. Odstředěním při 6000 g po 20 min. při 2 °C ssedla nepatrná sraženina a roztok nad sraženinou se vyčeřil. Nepatrné množství sraženiny nám nedávalo možnost pro-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Tabulka 1.

Globulin	Antigen	Ssedlina	Precipitace												Aglutinace							
			polysacharid pneum. III				polysacharid *Kleb. rhin.*				arab. guma				suspense pneumokoka III				suspense pneumokoka VIII			
			supernatant	sraženina			supernatant	sraženina			supernatant	sraženina			supernatant	sraženina			supernatant	sraženina		
				extrakt 15% NaCl	extrakt po $Ba(OH)_2$	extrakt po zprac. $CaCl_2$		extrakt 15% NaCl	extrakt po $Ba(OH)_2$	extrakt po zprac. $CaCl_2$		extrakt 15% NaCl	extrakt po $Ba(OH)_2$	extrakt po zprac. $CaCl_2$		extrakt 15% NaCl	extrakt po $Ba(OH)_2$	extrakt po zprac. $CaCl_2$		extrakt 15% NaCl	extrakt po $Ba(OH)_2$	extrakt po zprac. $CaCl_2$
norm. sera	–	+[1]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
norm. sera	polysach. pneum. III	++[1]	–	–[2]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
norm. sera	arab. guma	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	polysach. pneum. III	+	–	–	–	–																
antipneum.	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
antipneum.	polysach. pneum. III	++	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	±	–	–	–	–	–	–
antipneum.	arab. guma	++	±	±	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	arab. guma	–																				

[1]) z 10 konaných pokusů ve 2 případech se ssedlina nevytvořila
[2]) z 10 konaných pokusů byl 1 positivní

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

vést hlubší analysu. Při dalším zpracování podle Kruegera a Heidelbergera (1951) jsme zjistily, že po vyvolání fenolovým reagens dává zabarvení v mezích chyby metody. Další reprodukce se stejným výsledkem se nám nezdařila, naopak i přípravky získané ostatními postupy byly ve všech případech precipitačně i aglutinačně negativní, pokud jsme použily γ-globulinu normálního sera a polysacharidu pneumokoka III. U kontrolních přípravků, získaných po zpracování sraženiny vytvořené z antipneumokokového γ-globulinu (získaného z antipneumokokového sera titru 1 : 32 až 64) a polysacharidu pneumokoka III, byly testy slabě positivní.

Jediný positivní výsledek s polysacharidem pneumokoka III, získaný v serii pokusů, nepovažujeme za průkazný s hlediska specifické reakce protilátky. Je pravděpodobné, že molekuly jak γ-globulinu, tak polysacharidu během 14 dnů při 57 °C se pozmění tím způsobem, že dochází při dalším dodání čerstvého roztoku polysacharidu k vypadávání jedné nebo druhé složky, aniž by se tvořil specifický precipitát. Je také možné, že po přidání čerstvého roztoku polysacharidu k roztoku obsahujícímu globulin normálního sera a částečně ještě původní polysacharid, může, dojít k tvorbě komplexu γ-globulinu a polysacharidu mechanickým způsobem, aniž došlo k stejným strukturním vztahům, k jakým dochází při tvorbě protilátky po vpravení antigenu živočichu.

Ze svých výsledků usuzujeme, že za daných laboratorních podmínek nelze získat bílkovinu pozměněnou tak, aby měla charakter protilátky.

Souhrn

Pokusily jsme se o ověření tvorby protilátek z γ-globulinu normálního sera v přítomnosti antigenu in vitro inkubací směsi při 57 °C po dobu čtrnácti dnů. Reakci antigenu s protilátkou jsme vyhodnocovaly serologicky a polarograficky. Zjistily jsme, že za daných podmínek pokusů nedochází k specifické změně γ-globulinu vlivem antigenu.

Za technickou spolupráci děkuji H. Krištofové.

Literatura

Bacon, D. K.: *Preparation of synthetic immune serum and nature of immunity.* Arch. Inter. Med. 72 : 581, 1943.

Cohn, E. J., Luetscher, J. A. Jr., Oncley, J. L., Armstrong, S. H. Jr., Davis, B. D.: *Preparation and properties of serum and plasma proteins. III. Size and charge of proteins separating upon equilibration across membranes with ethanol-water mixtures of controlled pH, ionic strength and temperature.* J. Am. Chem. Soc. 62 : 3396, 1940.

Heidelberger, M., Kendall, F. E., Scherp, H. W.: *The specific polysacharides of types I, II and III Pneumococcus. A revision of methods and data.* J. Exp. Med. 64 : 559, 1936.

Hořejší, J., Smetana, R.: *O vlivu rivanolu na plasmatické bílkoviny.* Chem. listy 48 : 758, 1954.

Kabat, E. A., Mayer, M. M., Heidelberger, M.: *Experimental immunochemistry.* Springfield 1948.

Kauffmann, F., Bjorneboe, M., Vammen, B.: *Über die Herstellung und Bewertung von Kaninchen-Pneumokokken-Seren.* Zschr. Hyg. Infekt. 121 : 36, 1938.

Krueger, R. C., Heidelberger, M.: *The microestimation of antibodies with one milliliter samples of antisera of low antibody content.* J. Lab. Clin. Med. 38 : 157, 1951.

Kuzin, A M., Nevreva, N. A.: *K voprosu obrazovanija antitel in vitro.* Biochimija 12 : 49, 1947.

Pauling, L., Campbell, D. H.: *The manufacture of antibodies in vitro.* J. Exp. Med. 76 : 21, 211, 1942.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

К вопросу опытов образования антител in vitro

М. Грубешова

Резюме

Мы сделали попытку проверить образование антител из γ-глобулина нормальной сыворотки в присутствии антигена in vitro, путем двухнедельной инкубации этой смеси при 57 ° С. Мы производили серологическую и полярографическую оценку реакции антигена с антителом и убедились, что при данных условиях опыта специфическое изменение γ-глобулина под влиянием антигена не осуществляется.

Notes on Experiments on the Formation of Antibodies in vitro

M. Hrubešová

Summary

An attempt was made to verify the formation of antibodies from the gamma globulin of normal serum in the presence of an antigen in vitro, by incubating the mixture at 57° C for 14 days. The reaction of the antigen with the antibody was evaluated serologically and polarographically. It was found that under given experimental conditions no specific change took place in the gamma globulin as a result of the action of the antigen.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Význam stafylokokového α toxinu a leukocidinu

JIŘÍ JOHANOVSKÝ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 6. 8. 1956

Za hlavní nástroj patogennosti stafylokoků je téměř všeobecně uznáván stafylokokový α toxin. Tento názor se opírá o podobnost patologických stavů, vyvolaných vstříknutím toxinu nebo živé kultury pokusným zvířatům (Burnet 1929), o vztah mezi tvorbou toxinu a choroboplodností pro pokusná zvířata (Christie, North a Parlin 1946, Selbie a Simon 1952), o souběžnosti antitoxické imunity a odolnosti vůči experimentální infekci (Ramon 1936, Downie 1937) a o výskyt α toxinu u převážné většiny patogenních stafylokoků lidského původu (Schwabacher a sp. 1945, Marks 1952). Na základě tvorby α toxinu jsou též vybírány kmeny, kultivační půdy a metody purifikace při přípravě stafylokokového anatoxinu (Ramon 1950, Vygodčikov 1950; Wittler a Pillemer 1948, Turpin a sp. 1954).

Je však nápadné, že stafylokokový α toxin hemolysuje erytrocyty a usmrcuje leukocyty různých pokusných zvířat, avšak nikoliv lidské, nebo pouze v nepatrné míře. Proto vzbudil pochopitelný zájem objev stafylokokového leukocidinu, odchylného od α toxinu, specifického pro lidské leukocyty (Panton a Valentine 1932, Valentine 1936, Proom 1937).

Na základě rozboru kmenů a protilátkových odpovědí nevelkého počtu nemocných bylo zjištěno, že existuje užší vztah mezi závažností stafylokokové infekce a tvorbou specifického leukocidinu než tvorbou α toxinu a že odolnost souvisí spíše s přítomností antileukocidinu než antitoxinu. Byl vysloven i předpoklad, že účinek antistafylokokových léčebných ser závisí na přítomnosti antileukocidinu (Valentine a Butler 1939). Tyto práce nebyly od té doby opakovány ani prověřeny. Přispěla k tomu i pracná a zdlouhavá metodika průkazu specifického stafylokokového leukocidinu, spočívající na mikroskopickém hodnocení poškození leukocytů.

Pro zhodnocení významu specifického stafylokokového leukocidinu jsme se rozhodli prověřit uváděné starší údaje na větším materiálu. Vypracovali jsme vlastní metodu snadného průkazu stafylokokového leukocidinu, analogicky jako je možno rozlišit barvením živé a mrtvé bakterie (I. Málek 1954). U několika set stafylokokových kmenů různého původu jsme určili kvantitativně produkci α toxinu a specifického leukocidinu a srovnali je s vyvolaným patologickým procesem.

Materiál a metody

Stafylokokové kmeny jsme získali z větší části z diagnostické laboratoře Ústavu lékařské mikrobiologie v Praze a v Bratislavě, část jsme zachytili sami ve spolupráci s porodnickým oddělením nemocnice v Motole. Všechny kmeny tvořily koagulásu a aglutinovaly plasma na sklíčku.

Toxin a leukocidin jsme získávali produkcí na celofánu (Johanovský 1956a). V řadě paralelních i opakovaných produkcí jsme si ověřili, že touto metodou dostáváme u týchž kmenů rovnoměrné výsledky jen s nepatrným kolísáním titrů.

Specifický leukocidin jsme titrovali takto: k různým ředěním (1 : 4 až 1 : 512) toxinu jsme přidali stejný objem (0,1 ml) lidských krvinek, čerstvě odebraných do ředěného heparinu a třikrát promytých v Tyrodově roztoku. Po hodinové inkubaci v termostatu jsme přidali 0,1 ml 1% kongočerveně a po 3 minutách stejné množství 0,2 % nilské modři. Krev jsme prohlíželi jako nativní preparát objektivem 20 nebo 45; živé leukocyty jsou zbarveny bledě modře, usmrcené červenohnědě, při větších koncentracích toxinu jsou leukocyty úplně vymizelé. Počítali jsme živé a usmrcené leukocyty vždy až do zcela jasného zjištění výsledku v daném vzorku, zpravidla dostačilo dvojí projetí preparátu s určením 15—20 leuko-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

cytů, neboť hranice titrace je dosti ostrá. Za titr leukocidinu pokládáme to zředění, kde jsou leukocyty většinou nebo všechny usmrcené. Kontrolní preparáty ukazují přes 90 % živých elementů.

Tuto svou metodu jsme prověřovali co do spolehlivosti a srovnávali kvantitativně s jinými metodami k určení stavu leukocytů. Při opakovaných titracích 25 vzorků toxinu jsme ze 120 titrací dosáhli v 96 % případů výsledku shodného nebo lišícího se v rozmezí jednoho stupně ředění. Metodu jsme též srovnávali s určením životnosti leukocytů pomocí změny redukční schopnosti (Jensen a Maaloe 1950), supravitálním barvením jader (Kredel a Sant 1936) a barvením methylenovou modří (Říman 1957). Kvantitativně jsme pak určili, že uvedenou metodou zjišťujeme stejné titry leukodicinu jako metodou mikroskopického hodnocení (Panton a Valentine 1932) a určením životnosti leukocytu podle schopnosti fagocytosy (Pučkov a Titova 1952).

Protilátky vůči specifickému leukodicinu jsme určovali jako ředění sera, neutralisující pracovní dávku leukocidinu. Antigenní účinnost byla zjišťována in vitro podle vazebné schopnosti s příslušnou protilátkou, in vivo podle vzniku antileukocidinu podobně jako v dřívější práci s α toxinem (Johanovský 1956a), α toxin a antitoxin jsme titrovali běžnou hemolytickou metodou na králičích krvinkách

Výsledky

U různých stafylokokových kmenů, tvořících koagulasu, jsme podrobili kvantitativnímu rozboru schopnost vytvářet α toxin a specifický leukocidin. Kmeny byly zařazeny do několika skupin podle původu: I. kmeny isolované přímo z patologického procesu; II. kmeny od nemocných stafylokokovou nákazou, avšak nikoliv z patologického ložiska; III. kmeny z krku a nosu lidí bez manifestní stafylokokové infekce. Výsledek tohoto srovnání u 542 kmenů vzhledem k produkci α toxinu ukazuje obrázek 1. Na obrázku je uveden pro jednotlivé skupiny vždy počet kmenů, dosahujících daného titru α toxinu. Z obrázku vyplývá, že není rozdílu v rozvrstvení toxigennosti kmenů mezi jednotlivými skupinami, naopak se spíše zdá, že kmeny z patologického materiálu vytvářejí toxinu méně.

Tab. 1. Titry specifického leukocidinu u stafylokokových kmenů, isolovaných z různých chorobných procesů.

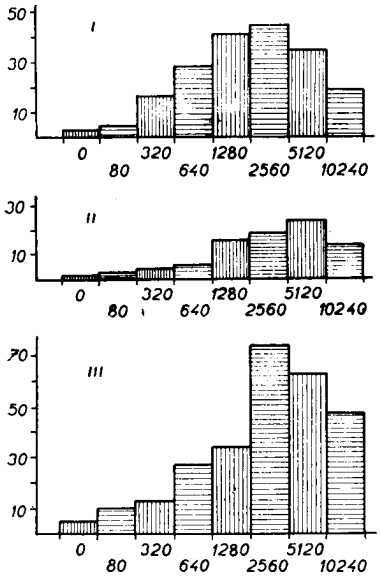
Onemocnění	Počet případů	Průměrný titr leukocidinu	Počet případů s titrem			
			0—16	32—64	128—256	256
Osteomyelitis, pyelonephritis s metastasemi	5	294	—	—	2	3
Otitis	11	164	—	5	3	3
Tonsilitis	5	147	—	1	4	—
Mastitis	20	130	1	6	9	4
Flegmona	7	128	1	1	3	2
Panaritium	4	128	—	1	3	—
Furunculosis	23	90	3	8	9	3
Puerperální subfebrilie	60	64	12	19	21	8
Pemfigus neonatorum	9	55	1	6	2	—
Absces, sekundární hnisání	53	46	13	29	7	4
Ekzem	41	37	12	20	9	—
Puerperium afebrilní	52	11,5	38	9	5	1
Krk, nos, zdraví lidé	146	12	98	24	21	3

Výsledek určení specifického leukocidinu u 476 kmenů ukazuje obrázek 2. Pro větší názornost jsme rozdělili kmeny z patologického materiálu do dvou skupin, a to jednak z procesů závažnějších (mastitis, flegmona, otitis atd.), jednak povrchních (zhnisaná poranění, ekzem atd.). Ukázalo se, že zde existuje jasná závislost. Kmeny z patologických procesů a od stafylokokových nemocných vůbec vytvářejí v převážné většině značné množství leukocidinu, kdežto většina kmenů od normálních lidí vytváří leukocidinu málo.

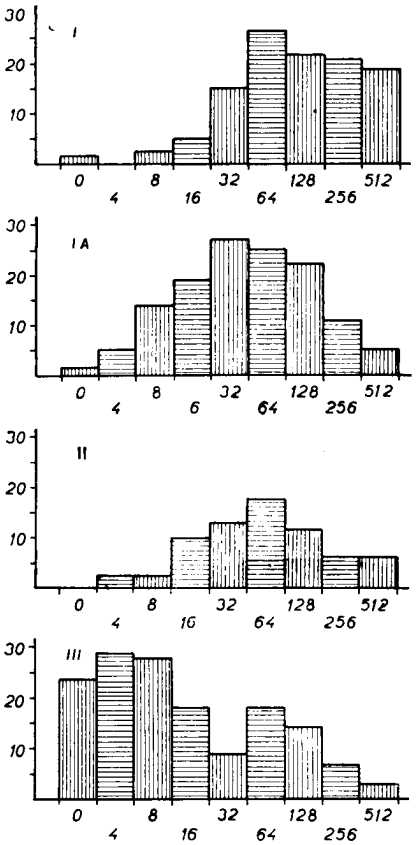
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Tento vztah je ještě názornější, rozdělíme-li kmeny z patologického materiálu do skupin podle jednotlivých chorobných procesů (tab. 1). Závislost mezi závažností vyvolaného procesu s titrem leukocidinu je výrazná. Statisticky významné jsou rozdíly na př. mezi skupinami kmenů z mastitid a kožních hnisání, abscesů a ekzemu ($P < 0{,}001$), kmeny z furunkulos a ekzemu ($P < 0{,}01$), mezi kmeny z ekzemu a z krku a nosu normálních lidí ($P < 0{,}001$) a pod. Zvláštní pozornosti si zaslouží skupina osmá a předposlední: jde o stafylokoky, kultivované z vagin v prvých dnech po porodu, rozdělené do dvou skupin podle toho, zda došlo či nedošlo k porodní subfebrilii, vyvolané stafylokokovou infekcí



Obr. 1. Titr α toxinu u kmenů různého původu: I. z patologického materiálu, II. z krku a nosu stafylokokových nemocných, III. od zdravých lidí. Osa x: titr toxinu, osa y: počet případů.



Obr. 2. Titr specifického leukocidinu u stafylokokových kmenů různého původu: I. z patologického materiálu, IA. z patologických procesů povrchních, II. z krku a nosu stafylokokových nemocných, III. od zdravých lidí. Osa x: titr leukocidinu, osa y: počet případů.

(Šebek, Schubert a Johanovský 1957). Je zřejmé, že právě ty kmeny, které mají schopnost vytvářet leukocidin, mohly vyvolat horečnatě probíhající infekci porodních cest ($P < 0{,}001$).

Na obr. 3 jsou uvedeny v souhrnu všechny kmeny, isolované od nemocných stafylokokovou nákazou a od zdravých lidí. Typický průběh křivky s dvěma vrcholy u kmenů od zdravých lidí ukazuje, že materiál zde obsažený není homogenní. Stafylokoky zdravých nosičů mají ve více než dvou třetinách případů titr leukocidinu 0 až 1 : 16, křivka ostatních kmenů ukazuje zcela stejný průběh jako křivka kmenů isolovaných z patologického materiálu, s maximem výskytu mezi 1 : 64 a 1 : 128.

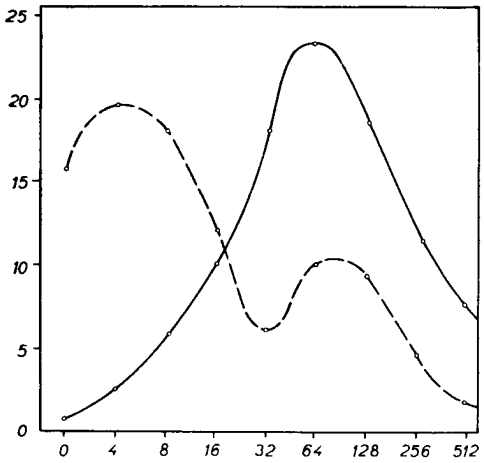
Dosažené výsledky nás opravňují k názoru, že specifický leukocidin hraje platnou

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

úlohu v patogenese stafylokokových infekcí. Proto jsme se jím zabývali i s hlediska přípravy očkovací látky typu anatoxinu a dosažené výsledky zde krátce shrnujeme.

Ověřili jsme si, že specifický leukocidin lze produkovat v polotuhých půdách různého složení, avšak vyšších titrů, až desetinásobných, jsme dosahovali při produkci na celofánu (Johanovský 1956a). Leukocidin je látka antigenní; je možno jej detoxikovat formolem za podobných podmínek jako α toxin. Při vhodné detoxikaci (0,2—0,3 % formolu za několik dní) nedochází k antigenním ztrátám; zkouška na vaznost se serem s protilátkami proti leukocidinu ukazuje přibližně totéž množství vážícího se antigenu v anatoxinu jako v původním toxinu.



Obr. 3. Souhrn titrů specifického leukocidinu u stafylokokových kmenů, isolovaných od lidí nemocných stafylokokovou nákazou a lidí zdravých. ———— kmeny od nemocných, — — — kmeny od zdravých. Osa x: titr leukocidinu, osa y: počet případů v procentech.

Při imunisaci vznikají u králíků po několika injekcích anatoxinu, připravovaného z kmenů s vysokým titrem leukocidinu protilátky, neutralisující několik desítek až několik set minimálních leukocidních dávek. Různě velká množství protilátek nacházíme též spolu s antitoxiny v krvi vyšetřovaných stafylokokových nemocných a rekonvalescentů. Toxin a leukocidin jsou látky antigenně zcela odlišné, jejich protilátky se navzájem neovlivňují. Při nedostatku vhodného standardního sera navrhujeme, aby za jednu jednotku antileukocidinu bylo pokládáno to množství protilátek, které právě neutralisuje 100 minimálních leukocidních dávek. Připravili jsme standardní antiserum; jakákoliv jiná sera lze titrovat srovnáním ředění standardního a zkoušeného sera, která mají právě neutralisační účinek na pracovní dávku leukocidinu.

Diskuse

Dosažené výsledky ukazují nespornou a statisticky významnou rozdílnost titrů leukocidinu mezi stafylokokovými kmeny z běžného nosičství u normálních lidí a kmeny z chorobného procesu. Stejně zvýšené titry leukocidinu nacházíme z krku a nosu nemocných stafylokokovou nákazou, o nichž je známo z rozborů serologických, fagotypisačních i jiných, že jde v převážné většině o týž kmen, jako ve vlastním infekčním procesu (Hobbs, Carrunthers a Gough 1947, Valentine a Hall-Smith 1952, Parker, Tomlinson a Williams 1955). Nadto jsme prokázali význačnou závislost mezi titrem leukocidinu a závažností klinického onemocnění. Tato paralela není pochopitelně absolutní, je však výrazná i tehdy, hodnotíme-li jenom ty skupiny nemocí, u nichž máme alespoň několik desítek vyšetření. Nalezené rozdíly jsou statisticky vysoce významné. Těmito výsledky potvrzujeme značně detailněji a na mnohem větším materiálu původní nálezy Pantona a Valentina (1932).

Možný diagnostický význam stafylokokového leukocidinu není v protikladu k běžnému určování koagulasy. Positivní tvorba koagulasy ukazuje příslušnost do skupiny stafylokoků, které lze pokládat za potenciálně choroboplodné. Zda daný kmen je skutečně a v jakém stupni choroboplodný, positivní koagulasový test neříká. Domníváme se, že právě zvýšený titr leukocidinu může mezi stafylokoky tvořícími koagulasu odlišit a určit kmeny silně patogenní od málo patogenních.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Je třeba zvážit, zda použitý pracovní postup může odpovědět na kladenou otázku o patogenetickém významu stafylokokového leukocidinu. Specifický stafylokokový leukocidin je látkou, namířenou selektivně proti lidským leukocytům. Jeho účinek na bílé krvinky králíka, morčete a krysy je ve srovnání s účinkem na lidské krvinky více než pětkrát slabší. Proto též lze význam specifického lidského leukocidinu hodnotit pouze rozborem materiálu z lidských infekcí, nikoliv pokusem na zvířeti, kde se jeho účinek dostatečně neprojeví, a je zakryt toxickým působením α toxinu. Jen pro úplnost upozorňujeme, že nesmí být zaměňován specifický lidský leukocidin (Panton-Valentinův) s leukocidním účinkem stafylokokového α toxinu, který však nepůsobí na lidské bílé krvinky (Proom 1937).

Větší množství produkovaného leukocidinu je souběžné s choroboplodností kmene a je jejím indikátorem; nelze však z daného materiálu uzavřít, že je její příčinou, i když z vlastního charakteru účinku (ochromování buněčné obrany organismu) vyplývá skutečná důležitost leukocidinu. O významu stafylokokového leukocidinu svědčí i to, že jeho titry u jednotlivých kmenů v našem materiálu jsou až 100krát vyšší, než jsou popisované titry leukocidinu streptokokového (Gay a Oram 1933).

Konečně je třeba porovnat naši představu o významu specifického leukocidinu s některými údaji o významu jiných látek, produkovaných stafylokoky. Uvedli jsme již, že stafylokokový α toxin má rozhodující význam při experimentální infekci na pokusných zvířatech. Jeho význam je nesporný při akutní hypertoxické stafylokokové sepsi (Burnet a Kellaway 1930, Kleiger a Blair 1940), není však dosud dostatečně objasněn při banálních formách stafylokokové infekce. Zjistili jsme, že titry α toxinu jsou v podstatě stejné u kmenů, isolovaných od nemocných i zdravých lidí. To se shoduje s jednotlivými literárními údaji o nízké tvorbě α toxinu u kmenů z klinicky těžkých infekcí (Mlčochová 1941, Blair 1939, Lack a Wailling 1954), i s pracemi autorů (Stevans a Cort 1926, Tager a Hales 1947), kteří nemohli zjistit na větším počtu kmenů závislost mezi množstvím produkovaného α toxinu a koagulasy a klinickou choroboplodností. Opačné nálezy jsou málo přesvědčivé; Marks (1952) určuje pouze šíři hemolytické zony kolem vyrostlých kolonií, Jackson a Dowling (1955) posuzují „choroboplodnost" kmene podle toho, zda jej vykultivovali z horní nebo hlubší části dýchacích cest při poliomyelitické obrně dýchacího ústrojí. Uvedené nálezy nesmějí být chápány jako popírání četných údajů o důležité úloze α toxinu v patogenese stafylokokové infekce; jeho význam však nelze pokládat za absolutní.

U nás byla zvláště výrazně formulována patogenetická koncepce některých forem stafylokokových onemocnění na základě tvorby hyaluronidasy (P. Málek 1955). Hyaluronidasa svým účinkem jistě výrazně modifikuje obraz probíhající stafylokokové infekce (na př. její šíření), nemůže však vysvětlit její vznik, uchycení a pomnožení mikrobů v tkáni. Podobně se nevylučují naše nálezy s pracemi o vztahu mezi výskytem fibrinolysinu a závažností klinické infekce (Madison 1935) a progredujícím charakterem experimentální stafylokokové infekce (Selbie a Simon 1952) a s pracemi o významu stafylokokové lecithinasy (Čistovič 1955, Gillespie a Adler 1952, Adler a sp. 1953).

Otázka mechanismu účinku a relativního významu jednotlivých stafylokokových toxinů a enzymů je všeobecně závažným a těžko řešitelným úkolem. Proto někteří badatelé dnes ustupují od pracné analysy těchto vztahů a spokojují se zjištěním, že existuje závislost mezi úplným vybavením stafylokokových kmenů známými toxiny a enzymy a experimentální i klinickou choroboplodností těchto kmenů (Lack a Wailling 1954) nebo mezi počtem antigenů, precipitujících v agaru s komplexním antiserem, a experimentální patogenitou (Howard 1954) a klinickou závažností vyvolané infekce (Elek a Levy 1950).

Je pochopitelné, že velmi důležitým faktorem u lidských stafylokokových infekcí jsou nejen vlastnosti mikroba, ale i stav imunity a přecitlivělosti makroorganismu (Johanovský 1956b), poměry hygienicko-epidemiologické, atd. Bylo by však chybou vyvozovat z uznání jejich významu závěr, že mikrobní činitel, jeho virulence a toxičnost nemá u stafylokokových infekcí význam.

Praktické využití našich výsledků je možné ve dvou směrech: s hlediska diagnostického a vlastního imunologického. Zvýšená tvorba leukocidinu ukazuje se značnou pravděpodobností na infekční původ a tím i na virulenci daného kmene. Pouze 13 % kmenů infekčního původu mělo v našich pokusech titr leukocidinu nižší než 1 : 16. Nálezy titrů leukocidinu u kmenů isolovaných od zdravých lidí je možno vzhledem k nalezené dvouvrcholové křivce (obr. 3) chápat tak, že převážná většina kmenů tvoří velmi malá množství leukocidinu; část vyšetřovaných osob jsou nosiči silně virulentních stafylokoků stejných vlastností jako kmeny, isolované přímo z patologického materiálu. Tento oprávněný předpoklad by bylo možno potvrdit sledováním epidemiologickým, na př. fagotypisačním; nález, že zvýšený titr leukocidinu ukazuje na př. mezi nemocničním personálem nosiče nebezpečných virulentních stafylokoků, by měl mimořádný praktický význam.

Druhou, ještě závažnější otázkou je využití našich nálezů v imunisační praxi a přípravě imunologických preparátů (anatoxin, antiserum). Dosud se vesměs vybírají kmeny, živné půdy a pracovní postupy, purifikace i hodnocení stafylokokových

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

preparátů na základě α toxinu. Domníváme se, že naše výsledky dokazují, že je třeba se stejnou závažností přihlížet i ke specifickému leukocidinu. Z literárních údajů pak vyplývá, že pro výběr vhodných produkčních kmenů je třeba již nyní brát jako kriterium i tvorbu fibrinolysinu, hyaluronidasy, lecithinasy a počet difusibilních antigenů, prokazovatelných při precipitaci v agaru.

Souhrn

1. Byla vypracována metoda snadného průkazu stafylokokového leukocidinu, specifického pro lidské krvinky, pomocí diferentního barvení usmrcených a živých leukocytů. Titr specifického leukocidinu byl určen u 476 kmenů různého původu, titr α toxinu u 542 kmenů.

2. U α toxinu není rozdíl titrů u kmenů různého původu. U specifického leukocidinu vytvářejí kmeny, isolované z patologického procesu, mnohem více leukocidinu než kmeny, isolované od zdravých osob. Korelace mezi titrem leukocidinu a závažností onemocnění, které dané kmeny vyvolaly, je statisticky významná. Charakteristika kmenů isolovaných od zdravých osob ukazuje, že jde o nehomogenní skupinu, zahrnující jak banální nosičství málo patogenních stafylokoků, tak nosičství kmenů stejných vlastností jako kmeny infekčního původu.

3. Tyto výsledky ukazují možnost diagnosticky určit podle tvorby leukocidinu zvlášť virulentní a nebezpečné kmeny stafylokoků. Pro přípravu očkovací látky a léčebného stafylokokového sera je třeba vybírat kmeny a pracovní postupy nejen podle titrace α toxinu, ale i podle tvorby specifického leukocidinu.

Za technickou spolupráci děkuji M. Buriánové.

Literatura

Adler, V. G., Gillespie, W. A., Herdan, G.: *Production of opacity in egg-yolk broth by Staphylococci from various sources.* J. Path. Bact. 66 : 205, 1953.

Blair, J. E.: *The pathogenic Staphylococci.* Bact. Rev. 3 : 97, 1939.

Burnet, F. M.: *The exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus.* J. Path. Bact. 32 : 717, 1929.

Burnet, F. M., Kellaway, C. H.: *Recent work on staphylococcal toxins with special reference to the interpretation of the Bundaberg fatalities.* Med. J. Austr. 17 : 295, 1930.

Čistovič, G. N.: *Biologičeskaja charakteristika stafilokokkov i jeje svjaz s uslovijami obitanija etich mikrobov.* Leningrad 1955.

Downie, A. W.: *A comparison of the value of heat-killed vaccine and toxoid as immunising agents against experimental staphylococcal infection in the rabbit.* J. Path. Bact. 44 : 573, 1937.

Elek, S. D., Levy, F.: *Diffusible antigens in staphylococcal cultures.* Brit. J. Exp. Path. 31 : 358, 1950.

Gay, F. P., Oram, F.: *Streptococcal leucocidin.* J. Immunol. 25 : 501, 1933.

Gillespie, W. A., Adler, V. G.: *Production of opacity in egg-yolk media by coagulase positive Staphylococci.* J. Path. Bact. 64 : 187, 1952.

Hobbs, B. C., Carrunthers, H. L., Gough, J.: *Sycosis barbae: serological types of Staphylococcus pyogenes in nase and skin, and results of penicilline treatment.* Lancet II. : 572, 1947.

Howard, J. G.: *Diffusible antigens in relation to the virulence to mice of Staphylococcus aureus.* J. Path. Bact. 68 : 177, 1954.

Christie, R., North, E. A., Parlin, B. J.: *Criteria of pathogenicity in Staphylococci.* Austr. J. Exp. Biol. 24 : 73, 1946.

Jackson, G. G., Dowling, H. F., Lepper, M. H.: *Pathogenicity of Staphylococci. A comparison of α hemolysin production with the coagulase test and clinical observations of virulence.* New England J. Med. 252 : 1020, 1955.

Jensen, T., Maaloe, O.: *A study of the action of staphylococcal toxin on leucocytes.* Acta path. microb. Scand. 27 : 313, 1950.

Johanovský, J.: *Příprava stafylokokového toxinu a anatoxinu kultivací na celofánu.* Čs. epid. mikr. 5 : 41, 1956a.

Johanovský, J.: *Vztah imunity a sensibility u experimentální stafylokokové infekce.* Čas. lék. čes. 95 : 455, 1956b.

Kleiger, B., Blair, J. E.: *Correlation between clinical and experimental findings in cases showing invasion of the blood stream by Staphylococci.* Surg. Gyn., Obst. 71 : 770, 1940.

Kredel, F. E., Sant, H. M.: *Viability of cells in inflammatory exsudates.* Arch. Pathol. 22 : 464, 1936.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Lack, C. H., Wailling, D. G.: *A study of 435 strains of Staphylococcus with reference to factors which may contribute to pathogenicity.* J. Path. Bact. 68 : 431, 1954.
Madison, F. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 53 : 209, 1935, cit. H. Schmidt: *Grundlagen der spezifischen Therapie.* Berlin 1940.
Málek, I.: *Nerovnocennost bakterijních buněk při dělení.* Čs. biologie 3 : 135, 1954.
Málek, P.: *Poporodní zánět prsu.* Praha 1955.
Marks, J.: *Recognition of pathogenic Staphylococci with notes on non specific staphylococcal haemolysin.* J. Path. Bact. 64 : 175, 1952.
Mlčochová, M.: *Výroba pyokokového toxinu.* Čas. lék. čes. 80 : 298, 1941.
Panton, P. N., Valentine, F. C. O.: *Staphylococcal toxin.* Lancet I : 506, 1932.
Parker, M. T., Tomlinson, A. J. H., Williams, R. E. O.: *Impetigo contagiosa. The association of certain types of Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes with superficial skin infections.* J. Hyg. 53 : 458, 1955.
Proom, H.: *The interrelationship of staphylococcal leucocidins.* J. Path. Bact. 44 : 425, 1937.
Pučkov, N. V., Titova, S. M.: *Modifikacija metoda dlja izučenija fagocitarnoj aktivnosti lejkocitov.* Fiziol. žurn. 38 : 456, 1952.
Ramon, G.: *Le principe des anatoxines et ses aplication.* Paris 1950.
Ramon, G., Richou, R., Djourichitch, M.: *Sur le méchanisme de l'immunité conférée par l'anatoxine staphylococcique á l'égard de l'infection par les staphylocoques virulents.* Rev. d'Immunol. 1 : 482, 1936.
Říman, J.: *Ontogenetický vývoj kostní dřeně u krys.* Rozpravy ČSAV, 1957.
Selbie, F. R., Simcn, R. D.: *Virulence to mice of Staphylococcus pyogenes, its measurement and its relation to certain in vitro properties.* Brit. J. Exp. Path. 33 : 315, 1952.
Schwabacher, H., Cunliffe, A. C., Williams, R. E. O., Harper, G. J.: *Identification of pathogenic Staphylococci.* Brit. J. Exp. Path. 26 : 124, 1945.
Stevans, F. A., Cort, L.: *Toxicity of filtrates of Staphylococcus aureus from human infections and from normal nasopharynx.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 24 : 392, 1926.
Šebek, V., Schubert, J., Johanovský, J.: *Význam stafylokokové vaginální infekce pro vznik poporodní subfebrilie.* Čs. gynaekologie 1957, v tisku.
Tager, M., Hales, H. B.; *Quantitative coagulase and toxin production by Staphylococci in relation to the clinical source of the organism.* Yale J. Biol. Med. 20 : 41, 1947.
Turpin, A., Relyveld, E. H., Pillet, J., Raynaud, M.: *Purification de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique alpha.* Ann. inst. Pasteur 87 : 185, 1954.
Valentine, F. C. O.: *On the role of the toxin in staphylococcal infections.* Lancet I : 526, 1936.
Valentine, F. C. O., Butler: *Specific immunity in acute staphylococcal osteomyelitis.* Lancet I : 973, 1939.
Valentine, F. C. O., Hall-Smith, S. P.: *Superficial staphylococcal infections.* Lancet II : 351, 1952.
Vygodčikov, G. V.: *Mikrobiologija i immunologija stafilokokkovych zabolevanij.* Moskva 1950.
Wittler, R. G., Pillemer, L.: *The immunochemistry of toxins and toxoids. V. The solubility of staphylococcal toxin in methanol-water mixtures under controlled conditions of pH, ionic strength and temperature.* J. Biol. Chem. 23 : 174, 1948.

Значение стафилококкового альфа токсина и лейкоцидина

Ю. Йогановский

Резюме

Был разработан удобный метод доказательства наличия специфического для кровяных телец человека стафилококкового лейкоцидина с помощью дифференциальной окраски убитых и живых лейкоцитов. Титр специфического лейкоцидина был определен у 476 штаммов, а титр альфа-токсина — у 542 штаммов различного происхождения. У альфа-токсина между штаммами различного происхождения нет разницы в титре. У специфического лейкоцидина штаммы, изолированные в ходе патологического процесса, образуют гораздо больше лейкоцидина, чем штаммы, выделенные от здоровых лиц. Существует статистически значимая корреляция между титром лейкоцидина и серьезностью заболевания, вызванного данным штаммом. Характеристика штаммов, выделенных от здоровых лиц, показывает, что речь идет здесь о неоднородной группе, включающей как банальное бациллоносительство малопатогенных стафилококков, так и носительство штаммов таких же свойств, как и штаммы инфекционного происхождения. Полученные нами результаты открывают возможность диагностического определения особо вирулентных и опасных штаммов стафилококков по образованию лейкоцидина. Для приготовления анатоксина и лечебной плотивостафилококковой сыворотки следует подбирать штаммы и рабочие приемы не только на основании результатов титрации альфа-токсина, но и по степени выделения специфического лейкоцидина.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

The Significance of Staphylococcal α toxin and Leucocidin

J. Johanovský

Summary

A method for the simple demonstration of leucocidin specific for human blood cells was elaborated, by means of differential staining of killed and living leucocytes. The titre of specific leucocidin was determined in 476 strains, and the titre of alpha-toxin in 542 strains, all of different origin. In the case of alpha-toxin there is no difference in the titre in strains of different origin. In the case of specific leucocidin, strains isolated from a pathological process form far more leucocidin than strains isolated from healthy subjects. There is a statistically significant correlation between the titre of the leucocidin and the degree of severity of the desease evoked by the strains in question. The characteristics of the strains isolated from healthy subjects show that this is a non-homogenous group, which contains both banal carriers of only slightly pathogenic staphylococci and also carriers of strains with the same properties as those isolated from infections. These results demonstrate the possibility of diagnosing particularly virulent and dangerous strains of staphylococci according to the production of leucocidin. When preparing a toxoid and staphylococcal serum for therapeutic purposes, the strains and also the methods should be selected not only according the titration of alpha-toxin but also according to the production of specific leucocidin.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus*. IV.

Vliv iontů na tvorbu enzymu

JIŘÍ CHALOUPKA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 24. 5. 1956

Ionty jsou důležitými regulátory metabolických dějů. Mohou být aktivátory nebo inhibitory enzymů, ovlivňovat permeabilitu a pod. Biologicky nejvýznamnější kationty jsou K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} a Fe^{2+}. Pro tvorbu bílkovin a množení jsou nezbytné draslíkové a hořečnaté ionty (Cannon a sp. 1952, Frost a Sandy 1953, Foster a Heiligman 1949, Friedman a Fox 1954, Webb 1948, 1949, 1953). Zjišťovali jsme, zda je možno různými ionty, které jsou normální složkou živné půdy, ovlivnit růst kultury a tvorbu proteasy aktinomycetou *Streptomyces griseus*.

Materiál a metody

Kultura, způsob kultivace, měření proteolytické aktivity v kultivační tekutině a buňkách i příprava sušiny atd. jsou popsány v předchozích pracích (Chaloupka 1956).

Kultivační půdy. Waksmanova půda B (WB) obsahující ionty K^+, Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} a Zn^{2+} (Waksman 1950). Základní půda Z o složení: pepton 2 %, glukosa 2 %, kyselý fosforečnan amonný (zvlášť sterilisován) 0,1 %. Půda Z½, obsahující 1,0 % peptonu, 1,5 % glukosy a 0,1 % kyselého fosforečnanu amonného. Živné půdy jsme sterilisovali dvakrát při 110 °C, pH na počátku kultivace bylo 7,1 až 7,3.

Zkoušených iontů používali jsme vždy ve formě chloridů (s výjimkou Fe^{2+}, kde bylo použito $FeSO_4$) a vždy sterilisovali odděleně. Reagencie byly analyticky čisté.

Pracovní postup. Při dlouhodobých pokusech jsme 48 hod. starou kulturu aktinomycety, vyrostlou na základní půdě Z, naočkovali (1,0 ml na 100 ml živné půdy) do půdy Z ½ obsahující příslušný roztok iontů. Baňky jsme po naočkování inkubovali na třepačce a v určitých časových intervalech zjišťovali obsah sušiny a proteásovou aktivitu v kultivační tekutině i buňkách.

Při krátkodobých jsme pokusech kulturu, vyrostlou za 48 hod. na půdě Z, sterilně odstředili, promyli vodou a asepticky suspendovali ve vodě nebo roztoku živin, obsahujícím příslušný iont. Inkubaci a stanovení přírůstku aktivity jsme prováděli tak, jak je popsáno v předchozí práci (Chaloupka 1956),

Výsledky pokusů, uvedené v tabulkách a obrázcích, jsou průměrem z 8—12 měření, získaných ve 2—3 reprodukcích pokusu. Sušina (obsah bílkovin) je udávána v mg/1 ml kultury, proteásová aktivita v a . 10^{-4} mekv tyrosinu na 1 mg sušiny nebo 1 ml kultivační tekutiny (uvedeno vždy v textu).

Výsledky

Ionty mohou ovlivňovat kromě tvorby i aktivitu nebo stabilitu enzymu. Ověřili jsme si, zda ionty, tvořící součást živné půdy WB, jejichž vliv na tvorbu proteásy jsme v další práci sledovali, mohou působit tímto způsobem. Výsledky, zachycené v procentu aktivity bez přítomnosti iontů, jsou vyjádřeny v tabulkách 1 a 2.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

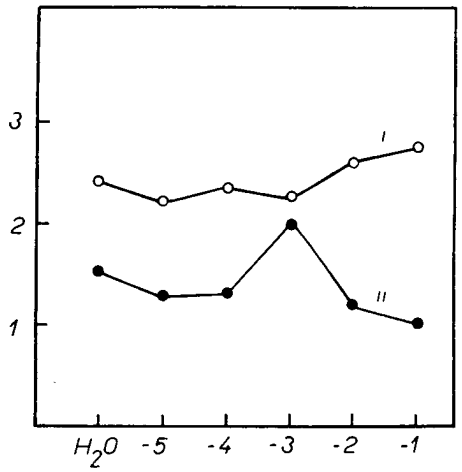
Tab. 1. Vliv iontů na aktivitu proteasy aktinomycety *Streptomyces griseus*
Aktivita enzymu je udána v procentech aktivity kontroly bez iontů

Koncentrace iontů M	Aktivita enzymu v přítomnosti různých iontů						
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Fe^{2+}	Zn^{2+}	komplexon III
$1 . 10^{-1}$	107,6	102,7	82,9	71,3	21,2	0,0	68,0
$1 . 10^{-2}$			105,9	104,0			
$1 . 10^{-3}$	99,9	95,8	100,9		93,1	78,7	

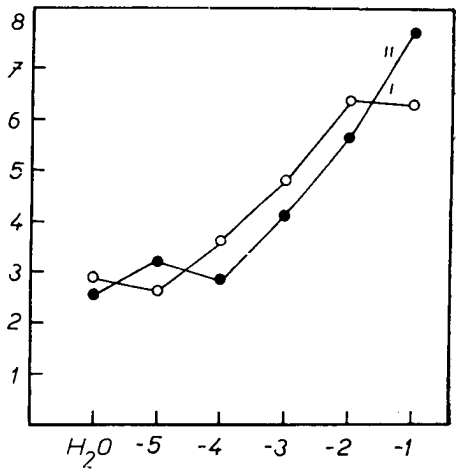
Tab. 2. Vliv iontů na stabilitu proteasy aktinomycety *Streptomyces griseus*
Aktivita je vyjádřena v procentech původní aktivity před inkubací při 30 °C

Koncentrace iontů M	Aktivita enzymu v přítomnosti různých iontů						
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{2+}	Mg^{2+}	H_2O
$1 . 10^{-1}$	81,8	82,6	97,3	0,0	20,0	85,3	83,9
$1 . 10^{-3}$	82,9	84,5	100,0	71,4	34,2	85,5	

Pokusy, uvedené v obou tabulkách, jsme prováděli s přečištěnými, dialysovanými enzymatickými preparáty. Při studiu aktivace proteasy příslušnými ionty jsme smísili roztok enzymu s vhodně naředěným roztokem iontů a směs uchovávali 30 min. při +4 °C. Potom jsme enzymatický preparát připipetovali k předehřátému roztoku kaseinu. Kaseinový substrát obsahoval sám ionty (především Ca^{2+}) a není proto možno z výsledků činit konečné závěry o aktivaci, případně neaktivaci proteasy *Streptomyces griseus* ionty, můžeme však posoudit jejich vliv na aktivitu enzymu za experimentálních podmínek, t. j. při měření aktivity na kaseinovém substrátě. Ionty těžkých kovů snižují aktivitu proteasy v koncentraci $1 . 10^{-1}$ M



Obr. 1. Vliv Na^+ na růst a tvorbu proteasy aktinomycety *Streptomyces griseus*.



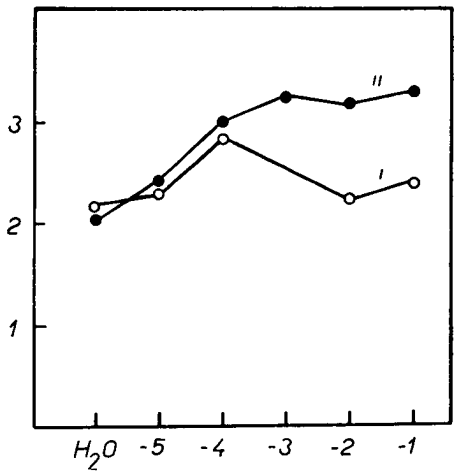
Obr. 2. Vliv K^+ na růst a tvorbu proteasy.

Osa x: log. koncentrace iontu, osa y: I. sušina v mg/1 ml, II. aktivita v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu na 1 mg sušiny

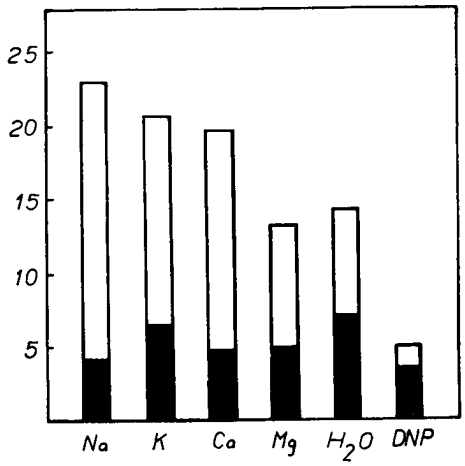
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

v sestupném pořadí $Zn^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. Jednomocné ionty Na^{+} a K^{+} neměly vliv. V koncentraci $1 . 10^{-3}$ M působí inaktivačně pouze Zn^{2+} a částečně Fe^{2+} Komplexon III význačně snižoval aktivitu proteasy.



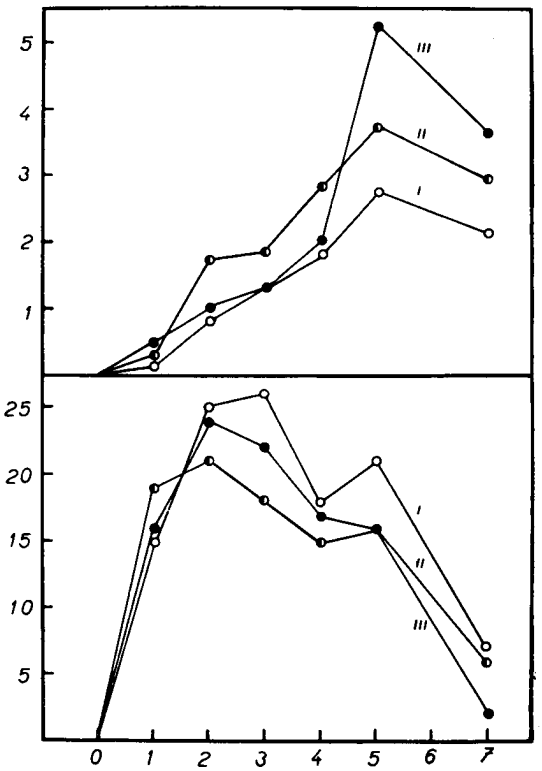
Obr. 3. Vliv Mg^{2+} na růst a tvorbu proteasy. Osa x: log koncentrace iontu, osa y: I — sušina v mg/1 ml, II — aktivita v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu na 1 mg sušiny.



Obr. 4. Vliv iontů na tvorbu proteasy v destilované vodě. Aktivita (osa y) v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu/1 mg sušiny. Černé sloupce: aktivita v buňkách; bílé sloupce: aktivita ve svrchní tekutině.

Při studiu stabilisačního vlivu iontů jsme roztok enzymu s ionty uchovávali 24 hod. při 30 °C pod oluolem. Aktivitu v tabulce 2 vyjadřujeme v procentech původní aktivity. Enzymy byly silně inaktivovány Zn^{2+} a Fe^{2+} a velmi význačně stabilisovány Ca^{2+}. Ostatní zkoušené ionty byly bez vlivu.

Pro sledování vlivu iontů na produkci proteasy jsme volili kombinaci dlouhodobých (pětidenních) a krátkodobých (dvacetičtyřhodinových) pokusů. Výsledky z dlouhodobých pokusů (obr. 1, 2 a 3) jsou vyjádřeny v maximální aktivitě (dosažené vždy 5. den), vztažené na 1 mg



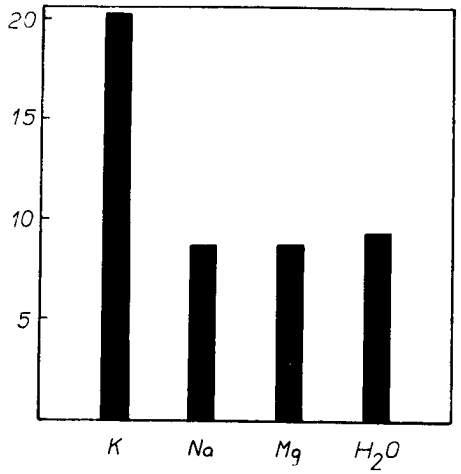
Obr. 6. Vliv Mg^{2+} na tvorbu proteasy v přítomnosti K^{+}. Půda WB, konc. K^{+} $1 . 10^{-2}$ M. Obsah Mg^{2+}: I — stopy přítomné v peptonu a glukose, II — $1 . 10^{-2}$ M, III $2 . 10^{-2}$ M. Osa x: dny kultivace, osa y: dolní část — mg bílkovin/10 ml, horní část — aktivita v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu/1 ml.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

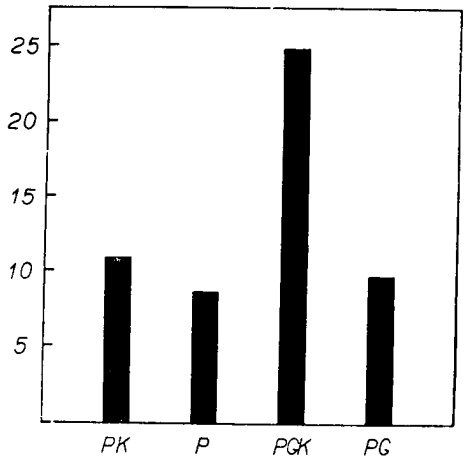
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

maximální sušiny (dvoudenní kultura). Hodnoty aktivity jsou součtem aktivity ve svrchní tekutině s aktivitou v buňkách.

Výsledky mohou mít pouze orientační charakter, protože během pokusu docházelo k značné inaktivaci proteasy. Ze studovaných iontů měly nejvýznačnější vliv draselné ionty, které zvyšovaly jak nárůst kultury (sušina), tak i tvorbu proteasy, a to v koncentracích, kdy bylo už dosaženo maximální sušiny a její množství se dále nezvyšovalo. Ionty Zn^{2+} a Fe^{2+} neovlivnily tvorbu enzymu v koncentracích pod $1 \cdot 10^{-3}$ M. Ve vyšších koncentracích enzym inaktivovaly.



Obr. 5. Vliv iontů na tvorbu proteasy v přítomnosti živin. Aktivita (osa y), vyjádřená v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu/1 mg sušiny, je součtem aktivity v buňkách i svrchní tekutině.



Obr. 7. Vliv K^+ na krátkodobou tvorbu proteasy v přítomnosti peptonu a peptonu s glukosou. P = pepton, G = glukosa, K = K^+ ionty. Aktivita (osa y), vyjádřená v a . 10^{-3} mekv. tyrosinu/1 mg sušiny, je součtem aktivity v buňkách i svrchní tekutině.

Tyto dlouhodobé pokusy jsme doplnili krátkodobými, v nichž jsme sledovali ovlivnění produkce proteasy jednak při inkubaci v destilované vodě (obr. 4), jednak v přítomnosti živin (obr. 5). Koncentrace iontů v těchto pokusech byla $5 \cdot 10^{-2}$ M. Výsledky uvádíme v přírůstku aktivity vztaženém na 1 mg sušiny. Při produkci v destilované vodě (obr. 4) byl úbytek sušiny ve všech případech stejný, produkce proteasy byla však proti kontrole stimulována ionty Na^+ a K^+ přibližně o 100 %. Účinek vápníkových iontů je možno vysvětlit jejich stabilisačním působením, hořečnaté ionty neměly vliv. V přítomnosti živin stimulovaly ze zkoušených iontů produkci proteasy pouze draslíkové ionty, které zvýšily obsah enzymu proti kontrole o více než 100 %. Hořečnaté ionty v těchto krátkodobých pokusech nezvýšily produkci enzymu. V přítomnosti K^+ zvyšují však tvorbu enzymu naprosto zřetelně (obr. 6).

Za všech těchto pokusů je zřejmé, že nejhlubší vliv na růst i tvorbu proteasy aktinomycetou mají draselné ionty, které zvyšovaly jak růst, tak i produkci enzymu. Je známo, že K^+ velmi významně zasahuje do metabolismu cukrů tím, že stimuluje část pochodů spojených s aerobní glykolysou (Ashford a Dixon 1935, Farmer a Jones 1942, Buchanan a sp. 1949, Hastings a sp. 1952, Rothstein a Demis 1953). Zjišťovali jsme proto ve svých pokusech (obr. 7), zda draselné ionty zasahují a usměrňují specificky přímo proteosyntesu, nebo zda působí nepřímo přes metabolismus glu-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

kosy. Inkubovali jsme proto mycel *Streptomyces griseus* jednak ve směsi glukosy a peptonu, jednak pouze v roztoku peptonu, vždy paralelně bez nebo s chloridem draselným v koncentraci 5 . 10^{-2} M. Pouze v přítomnosti glukosy stimulovaly draselné ionty významně tvorbu proteasy.

Diskuse

Tvorba proteasy grampositivními i gramnegativními mikroorganismy je stimulována ionty, především Ca^{2+} a Mg^{2+}, u *Bacillus subtilis* Mn^{2+} (Merill a Clark 1928, Haines 1931, Stockton a Wyss 1946). Účinek vápníku (Gorini a Crevier 1951) spočívá však spíše ve stabilisaci enzymu než ve zvýšení jeho produkce. V našich vlastních pokusech měly samotné ionty Mg^{2+} slabý nebo neměly stimulující účinek na tvorbu proteasy aktinomycetou *Streptomyces griseus*, v přítomnosti K^+ však produkci enzymu podstatně zvýšily. Velmi silný vliv na růst kultury i na tvorbu proteasy měly ionty draslíku. Jejich stimulující účinek na množství sušiny se projevil v koncentraci podstatně nižší než jejich účinek na tvorbu enzymu.

O působení draselných iontů na metabolismus je velmi mnoho údajů, namnoze spolu nesouvisících nebo docela protichůdných. K^+ je nezbytným biogenním prvkem i pro *Streptomyces griseus* (Acker a Lechevalier 1954). Svým působením zasahuje prakticky do všech metabolických dějů. Ovlivňuje asimilaci aminokyselin a proteosyntesu (Cannon a sp. 1952, Frost a Sandy 1953, Davies a sp. 1953), fixaci vzdušného dusíku (Fedorov 1950) i tvorbu purinů (Friedman a Fox 1954). Jeho nedostatek působí morfologické změny v jaderném aparátě (Fink 1950). Primární účinek draslíku spočívá však pravděpodobně v ovlivnění metabolismu cukrů (Farmer a Jones 1942, Barinova 1948, Hofmann a Scheck 1950, Sen a Sankhala 1953). K^+ proniká do buněk mikroorganismů pouze v přítomnosti hexosy na rozdíl od Na^+ (Leibowitz a Kupermintz 1942, Cowie a sp. 1949) a je v buňkách vázán pravděpodobně jako sůl hexosofosfátu (Roberts a sp. 1949). Je aktivátorem fosforylačních enzymů (Boyer a sp. 1942, Bergmann a sp. 1954), podmiňuje tvorbu metafosfátů v kvasinkách (Schmidt a sp. 1949) a je nezbytný pro syntesu glutathionu z γ-glutamylcysteinu a glycinu, spojenou s přenosem $\sim$P z ATP (Snoke a sp. 1953).

I naše pokusy s vlivem glukosy a K^+ v přítomnosti peptonu a glukosy na tvorbu proteasy svědčí pro koncepci, že účinek draslíku na proteosyntesu je spojen s ovlivněním metabolismu cukrů. Draselné ionty zvyšovaly produkci enzymu prakticky pouze v přítomnosti glukosy (obr. 7). Na podkladě pokusů, v nichž byl sledován vliv iontů na tvorbu proteasy bez přítomnosti živin v prostředí (obr. 4), je však možno soudit, že tento mechanismus nemusí být jediný. Protože v tomto případě stimuloval produkci enzymu i Na^+, kdežto Mg^{2+} a pravděpodobně i Ca^{2+} ji neovlivnily, zdá se nám možné, že se zde působení iontů projevilo především ovlivněním permeability buněk. Svědčí pro to jev, že v těchto pokusech došlo (především vlivem Na^+) k zvýšené sekreci enzymu do prostředí. Snad zvýšená difuse enzymu z buněk způsobila pokles jeho hladiny v buňkách a tím nepřímo umožnila jeho další syntesu.

Souhrn

Sledovali jsme vliv různých iontů na růst i tvorbu proteasy aktinomycetou *Streptomyces griseus* v dlouhodobých i krátkodobých pokusech.

Nárůst kultury, zjišťovaný množstvím sušiny, i produkce enzymu jsou významně stimulovány ionty K^+. Koncentrace K^+, nutná pro zvýšení sušiny, je nižší než koncentrace, nutná k ovlivnění tvorby proteasy.

Účinek draselných iontů spočívá pravděpodobně v ovlivnění metabolismu cukrů, protože jejich působení je podmíněno přítomností glukosy, vedle zdroje aminokyselin. V podmínkách krátkodobé produkce enzymu bez přítomnosti externích živin zvyšuje tvorbu proteasy vedle K^+ i Na^+. Účinek obou iontů souvisí snad v tomto případě s ovlivněním permeability.

Za technickou spolupráci děkuji O. Civínové.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Literatura

Acker, R. F., Lechevalier, H.: *Some nutritional requirements of Streptomyces griseus for growth and candicidin production.* Appl. Microbiol. 2 : 157, 1954.

Ashford, C. A., Dixon, K. C.: *The effect of potassium on the glucolysis of brain tissue with reference to the Pasteur effect.* Biochem. J. 29 : 157, 1935.

Barinova, S. A.: *Vlijanije kalija i magnija na razvitije Rhizopus nigricans i na jevo sposobnost' k kislotoobrazovaniju.* Mikrobiologija 17 : 10, 1948.

Bergmann, E. D., Littauer, U. Z., Volcani, B. C.: *Formation of d-3-phosphoglyceric acid from pentoses by Escherichia coli.* Biochem. J. 56 : 174, 1954.

Boyer, P. D., Lardy, H. H., Phillips, P. H.: *The role of potassium in muscle phosphorylations.* J. Biol. Chem. 146 : 673, 1942.

Buchanan, J. M., Hastings, A. B., Nesbett, F. B.: *The effect of the ionic environment on the synthesis of glycogen from glucose in rat liver slices.* J. Biol. Chem. 180 : 435, 1949.

Cannon, P. R., Frazier, L. E., Hughes, R. H.: *Influence of potassium on tissue protein synthesis.* Metabolism 1 : 49, 1952. C. A. 46 : 8216 g.

Cowie, D. B., Roberts, R. B., Roberts, J. Z.: *Potassium metabolism in Escherichia coli. I. Permeability to sodium and potassium ions.* J. Cell. Comp. Physiol. 34 : 243, 1949.

Davies, R., Folkes, J. P., Gale, E. F., Bigger, L. C.: *Assimilation of amino acids by microorganisms. XVI. Changes in sodium and potassium accompanying the accumulation of glutamic acid or lysine by bacteria and yeast.* Biochem. J. 54 : 430, 1953.

Farmer, S. N., Jones, D. A.: *Influence of potassium on sugar metabolism.* Nature, 150 : 768, 1942.

Fedorov, M. V.: *Vlijanije otdel'nych pitatel'nych elementov na fiksaciju azota atmosfery azotobakterom.* DAN SSSR 72 : 157, 1950.

Fink, H.: *Experimental investigations on the effect of a nutrient salt deficiency on mitosis in the root tips of Vicia faba.* Chromosoma 3 : 510, 1950.

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

Friedman, S., Fox, Ch. L., Jr.: *The relation of potassium to metabolism and purine synthesis in Escherichia coli.* J. Bact. 68 : 186, 1954.

Frost, D. V., Sandy, H. R.: *Effect of mineral deficiences on amino acid utilization. Critical role of potassium and phosphorus.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83 : 102, 1953.

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

Haines, R. B.: *The formation of bacterial proteases, especially in synthetic media.* Biochem. J. 25 : 1851, 1931.

Hastings, A. B., Feng, Ch. T., Nesbett, F. B., Sinex, F. M.: *Carbohydrate metabolism in rat liver slices. I. The effect of cations in the media.* J. Biol. Chem. 194 : 69, 1952.

Hoffmann, E., Scheck, H.: *Über den Einfluss des Kalium-Ions auf Bildung und Aktivität der Fermente bei Hefen und Schimmelpilzen.* Biochem. Ztschr. 321 : 98, 1950.

Chaloupka, J.: *Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus. II. Vliv povahy a koncentrace dusíku na sekreci proteasy.* Čs. mikrobiol. 1 : 32, 1956. — *III. Krátkodobá produkce enzymu.* Čs. mikrobiologie 1 : 241, 1956.

Leibowitz, J., Kupermintz, N.: *Potassium in bacterial fermentation.* Nature 150 : 233, 1942.

Merill, A. T., Clark, M. W.: *Some condition affecting the production of gelatinase by Proteus bacteria.* J. Bact. 15 : 267, 1928.

Roberts, R. B., Roberts, I. Z., Cowie, D. B.: *Potassium metabolism in Escherichia coli. II. Metabolism in the presence of carbohydrates and their metabolic derivates.* J. Cell. Comp. Physiol. 34 : 259, 1949.

Rothstein, A., Demis, C.: *The relation of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium.* Arch. Biochem. Biophys. 44 : 18, 1953.

Sen, H. D., Sankhala, R. H.: *Citric acid production of Aspergillus fumaricus.* Intern. Sugar. J. 55 : 273, 1953.

Schmidt, G., Hecht, L., Thannhauser, S. J.: *Effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by bakers' yeast.* J. Biol. Chem. 178 : 733, 1949.

Snoke, J. E., Yanari, S., Bloch, K.: *Synthesis of glutathione from γ-glutamylcystein.* J. Biol. Chem. 201 : 573, 1953.

Stockton, J. R., Wyss, A.: *Proteinase production by Bacillus subtilis.* J. Bact. 52 : 227, 1946.

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

Webb, M.: *Influence of magnesium on cell division. I. Growth of Clostridium welchii in complex media deficient in magnesium.* J. Gen. Microbiol. 2 : 275, 1948. — *II. The effect of magnesium on growth and cell division of various bacterial species in complex media.* J. Gen. Microbiol. 3 : 410, 1949.

Webb, M.: *Effect of magnesium on cellular division in bacteria.* Science 118 : 607, 1953.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Протеолитические энзимы актиномицета Streptomyces griseus. IV.

Влияние ионов на образование энзима

Ю. Халоупка

Резюме

С помощью длительных и краткосрочных опытов мы исследовали влияние различных ионов на рост и образование протеазы у лучистого грибка Streptomyces griseus. Нарастание культуры, выражающееся в количестве сухого вещества, и продукция энзимов заметно стимулируются ионами K^+. Концентрация K^+, необходимая для увеличения количества сухого вещества, бывает ниже, чем минимальная концентрация, влияющая на образование протеазы. Действие ионов калия заключается, вероятно, в их влиянии на метаболизм сахаров, так как их эффективность зависит, кроме источника аминокислот, и от присутствия глюкозы. В условиях краткосрочной продукции энзима без привнесения питательных веществ усиление образования протеазы стимулируется наряду с K^+ и ионами Na^+. Действие и тех, и других ионов связано, вероятно, в этом случае с их влиянием на проницаемость.

Proteolytic Enzymes of the Actinomyces Streptomyces griseus. IV.

The Influence of Ions on the Formation of Enzyme

J. Chaloupka

Summary

A study was made of the influence of various ions on the growth and formation of protease by the actinomyces Streptomyces griseus, in long- and short-term experiments. Growth of the culture, ascertained by the amount of dry substance, and production of the enzyme were stimulated significantly by K^+ ions. The concentration of K^+ required for increasing the amount of dry matter is lower than the concentration required for influencing the formation of protease. The effect of potassium ions probably consists in influencing metabolism of the sugars, because their effectiveness depends on the presence of glucose in addition to a source of amino acids. Under conditions of short-term production of the enzyme, without the presence of external nutrients, the formation of protease is increased by Na^+ as well as by K^+. In this case the effect of these two ions is possibly related to the influencing of permeability.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Nové způsoby biosyntetické výroby antibiotik. I.

Biosyntesa chlortetracyklinu bez dodržení aseptických podmínek

EDUARD BĚLÍK, MILOŠ HEROLD a JIŘÍ DOSKOČIL

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

Došlo 4. 10. 1956

Jak uvádí veškerá dostupná literatura, je jednou z hlavních podmínek dobrého průběhu produkce antibiotik sterilita půdy před očkováním a dokonalá ochrana kultury před cizí mikroflorou během kultivace (Beesch a Schull 1955).

Důvody pro tento požadavek jsou jasné při výrobě penicilinu, kde jakákoliv kontaminace hluboce pozmění metabolismus produkující kultury, sníží její růst a naruší průběh tvorby penicilinu (Silcox a Lee 1948, Lee 1949). Zvláště, rozmnoží-li se během fermentace gramnegativní bakterie, produkující penicilinásu (Rothe 1950, Pollock 1952, Hagihara 1950), je výtěžek penicilinu velmi snížen. Proto byly konány pokusy, jak při výrobě penicilinu omezit nebezpečí kontaminace. Knight a Frazier (1945) zjistili, že formol nebo kyselina boritá chrání čistotu kultury a při tom nepůsobí nepříznivě na produkční mikroorganismus. Fernandez (1953) se pokusil omezit rozmnožování cizích mikroorganismů při fermentaci penicilinu v laboratorním měřítku pomocí různých antiseptik, při čemž se nejlépe osvědčil toluen. V technické praxi však nedošly tyto způsoby uplatnění. Při fermentaci antibiotik se širokým spektrem účinnosti není kontaminace tak nebezpečná, neboť koncentrace antibiotika, obsaženého již v inokulu, chrání od počátku fermentační půdu před cizí mikroflorou, nebo alespoň nedovolí její podstatné pomnožení ve fermentační půdě. Specifické enzymy, které by rozkládaly antibiotika se širokým spektrem, podobně jako penicilinása inaktivuje penicilin, nebyly dosud popsány. Literatura však uvádí, že i při výrobě antibiotik se širokým spektrem účinnosti je nutno přísně dodržovat podmínky aseptické práce (Van Dyck a de Somer 1952, amer. pat. 2,609.329, 2,516.080, 2,653.899).

Vzali jsme si proto za úkol pokusně ověřit nutnost tohoto požadavku tím, že systematicky studujeme produkci jednotlivých antibiotik bez dodržení podmínek přísné asepse. V tomto sdělení referujeme o laboratorních pokusech fermentace chlortetracyklinu.

Materiál a metody

Mikroorganismy. Pracovali jsme s kmenem *Streptomyces aureofaciens* Bg. K záměrným infekcím jsme použili čistých kultur bakterií *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis,* kvasinek *Rhodotorula gracilis, Saccharomyces fragilis, Saccharomyces cerevisiae* R XII, *Torulopsis utilis* var. *maior, Torulopsis utilis* var. *thermophila, Hansenula anomala, Candida arborea, Candida tropicalis* a plísní *Oidium lactis.* Dále jsme použili přirozené směsi mikroorganismů, nacházejících se v zemině a vltavské vodě.

Kultivační metody. Produkční kmen *S. aureofaciens* Bg jsme uchovávali v pískových konservách při +5 °C. Sporové inokulum jsme připravovali kultivací při 28 °C po 10 dnů na námi sestavené sporu-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

lační půdě tohoto složení: sacharosa 0,3 %, dextrin 1,5 %, močovina 0,01 %, NaCl 0,05 %, K_2HPO_4 0,05 %, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 0,05 %, Pepton Medica 0,5 %, masový extrakt Difco 0,1 %, $FeSO_4 . 7 H_2O$ 0,001 % a agar Difco 3 %. Půda byla rozdělena do zkumavek, sterilována 40 minut při 116 °C a po sterilaci zešikmena; pH této půdy se pohybovalo v rozmezí 6,9 až 7,1. Jednou měsíčně jsme naočkovali z pískové konservy sporulační půdu a kultivovali jsme po dobu 10 dnů při teplotě 28—29 °C. Vysporulované kultury jsme uchovávali v lednici při +5 °C a používali jsme jich k pokusům po dobu jednoho měsíce. K přípravě vegetativního inokula, podobně jako k vlastní kultivaci jsme použili půdy podle Van Dycka a De Somera (1952), jejíž složení jsme poněkud pozměnili: sacharosa 3 %, sojová mouka 2 %, NaCl 0,5 %, $CaCO_3$ 0,4 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 %, melasa 0,2 %, kukuřičný výluh (50 % sušiny) 0,4 až 0,5 %; pH půdy jsme upravovali 20 % H_2SO_4 na 5,7 až 5,8. Půdu jsme rozlili po 80 ml do 500 ml varných baněk a sterilovali 40 minut při 120 °C. Po sterilaci se pH půdy pohybovalo v rozmezí 6,6 až 6,8. Výjimečně jsme použili 120 ml půdy v pokusech, v nichž jsme ověřovali vliv přenosu kyslíku.

Fermentace jsme prováděli na reciprokém třepacím stroji (97—99 kyvů/min., rozkmit 92—98 mm), při teplotě 28—29 °C.

Vegetativní inokulum kmene *S. aureofaciens* Bg jsme získali přenesením kličky spor ze sporulačního agaru do fermentační půdy v baňce a 24hodinovou kultivací na reciprokém třepacím stroji. Vegetativní inokulum obsahovalo přibližně 200 μg/ml chlortetracyklinu. Živnou půdu pro produkci chlortetracyklinu jsme očkovali 5 % vegetativního inokula a fermentovali 3—4 dny.

Kontaminující mikroorganismy *S. aureus*, *B. subtilis* a *E. coli* jsme kultivovali v tekutých bujonech 24 hodiny při teplotě 37 °C, kvasinky v sladinové tekuté půdě rovněž 24 hodiny, ale při teplotě 28 °C.

Analytické metody. Chlortetracyklin (CTC) v produkčních půdách jsme stanovili spektrofotometricky podle Levina a sp. (1949) z celého obsahu půdy v baňce po předchozím okyselení kyselinou šťavelovou na pH 2.

Přenos kyslíku v půdě jsme měřili siřičitanovou metodou podle Coopra a Fernstroma (cit. Finn 1954) a Vondráčkové (1957).

Hodnoty pH půd jsme měřili na elektronkovém pH-metru značky Metra.

Vyhodnocování pokusů. U každého pokusu jsme založili 6 baněk. Obsah chlortetracyklinu byl stanoven ve fermentačních půdách 3. a 4. den kultivace. Výsledky pokusů jsou průměry tří kultivací, které měly nejvyšší produkce antibiotika.

Výsledky

Kontrolní pokusy jsme provedli obvyklým způsobem za dodržení aseptických podmínek. Sterilní půda v baňkách byla očkována za dodržení všech obvyklých požadavků asepse a baňky při fermentaci byly uzavřeny vatovou zátkou. V těchto kontrolních seriích jsme dosahovali produkcí chlortetracyklinu 1000—1500 μg/ml, což byla tehdy normální produkce kmene *S. aureofaciens* Bg. na půdě uvedeného složení.

Tab. 1. Fermentace v uzavřených a v otevřených baňkách

Způsob fermentace	1. pokus	2. pokus	Průměr	Procento kontroly
	μg CTC/ml			
Uzavřené baňky	1305	1352	1328	100,0
Otevřené baňky	1212	1460	1336	100,6

Fermentace bez ochrany proti vzdušné kontaminaci jsme prováděli tak, že půda byla sterilována a očkována jako v kontrolních pokusech, ale baňky nebyly uzavřeny vatovou zátkou, nýbrž byly ponechány otevřené po celou dobu fermentace. V otevřených baňkách jsme dosahovali stejných produkcí jako v baňkách kontrolních, jak je patrno z tabulky 1. Běžnými zkouškami na kontaminaci, t. j. přeočkováním půdy do bujonu a na krevní agar, nebyla během fermentace v otevřených baňkách prokázána přítomnost cizích mikroorganismů.

Dalšími pokusy bylo zjištěno, že ani v několika po sobě jdoucích fermentačních převodech, kultivovaných vesměs v otevřených baňkách, nedojde ke zřetelné

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

kontaminaci a ke snížení produkce chlortetracyklinu (tab. 2). Půdu jsme očkovali vždy 5 % suspense 24 hodiny staré kultury z předchozí kultivace a baňky jsme inkubovali otevřené. Očkovali jsme přelitím suspense do čerstvé půdy bez dodržování asepse.

Tab. 2. Fermentace v uzavřených a otevřených baňkách ve čtyřech za sebou následujících kultivacích

Kultivace	Uzavřené baňky (průměr 2 pokusů) µg CTC/ml	Otevřené baňky (průměr 2 pokusů) µg CTC/ml	Procento kontroly
2.	1328	1339	100,8
3.	1244	1063	85,6
4.	1094	1099	100,2
5.	1267	1218	96,1

Tab. 3. Fermentace se 120 ml půdy v baňce

Způsob fermentace	1. pokus	2. pokus	Průměr	Procento kontroly
	µg CTC/ml			
Uzavřené baňky	401	587	494	100
Otevřené baňky	1542	1373	1458	294

Tab. 4. Fermentace na sterilované a povařené půdě

Způsob sterilace	1. pokus	2. pokus	3. pokus	Průměr	Procento kontroly
	µg CTC/ml				
40 minut při 120 °C	1423	1217	1320	1320	100,0
40 minut při 97—99 °C	1516	1537	1526	1526	115,5

Tab. 5. Fermentace záměrně kontaminované bakteriemi

Fermentace v baňkách	1. pokus	2. pokus	Průměr	Procento kontroly
	µg CTC/ml			
Kontrolní pokus	816	1174	995	100,0
Kontaminace 3 × 0,5 ml suspense bakterií	912	1273	1092	109,8

Jak ukazují pokusy o stanovení rychlosti přenosu kyslíku (Vondráčková 1957), dosahuje se v otevřených baňkách lepšího provzdušnění než v baňkách zavřených vatovými zátkami. Tento vliv se projevil při fermentaci se 120 ml půdy v baňce místo obvyklých 80 ml, kdy v uzavřených baňkách byla vlivem nedostatečného provzdušnění většího objemu půdy produkce silně snížena, kdežto v otevřených baňkách byla normální (tab. 3).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

V dalších pokusech jsme fermentovali na půdě jen částečně sterilované, a to zahřátím půdy v otevřené nádobě na 100 °C po dobu 40 minut. Jak je patrno z tabulky 4, není pro produkci chlortetracyklinu nutná sterilace za zvýšeného tlaku a postačí, omezíme-li masivní kontaminaci kultury vegetativními formami mikrobů, přítomných v surovinách, zahřátím půdy na 100 °C.

Když jsme zjistili, že je možná produkce chlortetracyklinu bez dodržení přísných aseptických podmínek, přikročili jsme v dalších pokusech k fermentacím tohoto antibiotika v produkčních půdách, které byly záměrně kontaminovány ihned po naočkování produkčního kmene kulturami bakterií a kvasinek nebo zeminou a říční vodou. Půdu (80 ml sterilované půdy v baňce) jsme po inokulaci kontaminovali 0,5 ml suspense bakterií nebo kvasinek. V jiných pokusech jsme přidávali 0,25 g zeminy nebo 1 ml vltavské vody (200.000 zárodků v ml). Kontaminované kultury jsme pak fermentovali v baňkách uzavřených vatovou zátkou, takže další kontaminace ze vzduchu byla vyloučena.

Tab. 6. Fermentace záměrně kontaminované kvasinkami

Kontaminující mikroorganismus	Průměr 2 pokusů µg CTC/ml	Procento kontroly
Kontrolní pokus	1338	100,0
Rhodotorula gracilis	1354	101,2
Sacharomyces fragilis	1240	92,7
Sacharomyces cerevisiae R XII	1317	98,3
Torulopsis utilis var. *maior*	794	59,4
Torulopsis utilis var. *thermophila*	840	62,8
Hansenula anomala	1302	97,4
Candida arborea	1360	101,7
Candida tropicalis	1302	97,4
Oidium lactis	1317	98,3

Tab. 7. Fermentace v baňkách záměrně kontaminovaných zeminou a říční vodou

Fermentace v baňkách	1. pokus	2. pokus	Průměr	Procento kontroly
	µg CTC/ml			
Kontrolní pokus	1309	1368	1338	100,0
Kontaminace 0,25 g zeminy	1260	1505	1382	103,2
Kontaminace 1 ml říční vody	1234	1525	1379	103,0

Zjistili jsme, že v kultivacích infikovaných směsí bakterií nebyla produkce chlortetracyklinu snížena oproti kontrole (tab. 5). Do 24. hodiny fermentace byly v infikované půdě prokázány mikroskopicky pouze bakterie *E. coli*, zatím co *B. subtilis* i *S. aureus* byly potlačeny velmi rychle, takže od 30. hodiny nebylo možno ani přenesením vzorku půdy na krevní agar prokázat jejich přítomnost.

V tabulce 6 je uvedena produkce chlortetracyklinu v kultivacích záměrně kontaminovaných různými druhy kvasinek. Jedině druhy rodu *Torulopsis* se v tomto pokuse silně pomnožily a podstatně snížily produkci chlortetracyklinu. Přerůstání kvasinek rodu *Torulopsis* bylo provázeno rychlým poklesem pH, takže se mezi 24.—48. hodinou úplně zastavil růst produkčního kmene *S. aureofaciens*.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Také při kontaminaci půdy zeminou a říční vodou jsme dosahovali stejných produkcí chlortetracyklinu jako u kontroly. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. V počátečních hodinách fermentace byla v infikovaných baňkách mikroskopicky zjištěna kontaminace gramnegativními silnými tyčinkami, ale ve 20. hodině byla již potlačena. Přeočkováním na bujon a krevní agary byla však přítomnost těchto tyčinek prokazována po celou dobu fermentace. Přesto nesnížila ani tato zjevná

Tab. 8. Fermentace v baňkách záměrně kontaminovaných gramnegativní tyčinkou resistentní vůči chlortetracyklinu

Fermentace v baňkách	1. pokus	2. pokus	Průměr	Procento kontroly
	μg CTC/ml			
Kontrolní pokus	1368	1315	1341	100,0
Kontaminace 0,5 ml suspense gramnegativní tyčinky	1646	1660	1653	123,0

kontaminace produkci chlortetracyklinu. Z těchto baněk byly isolovány dva kmeny gramnegativních tyčinek, resistentních vůči chlortetracyklinu. Jeden z těchto kmenů byl pomnožen v bujonu a v dalším pokuse byly fermentační půdy v baňkách tímto kmenem infikovány. Jak je patrno z tabulky 8, dosáhli jsme v půdách záměrně infikovaných tímto kmenem dokonce vyšší produkce chlortetracyklinu než v kontrolních čistých fermentacích (kontrola průměrně 1341 μg/ml chlortetracyklinu, rozptyl 1216—1454 μg/ml; infikované baňky průměrně 1653 μg/ml, rozptyl 1556—1734 μg/ml).

Diskuse

Při produkci chlortetracyklinu je potlačení růstu kontaminující mikroflory podmíněno širokým antimikrobním spektrem chlortetracyklinu, který působí bakteriostaticky téměř na veškerou běžně se vyskytující bakterijní kontaminaci. Předpokládáme, že vegetativní inokulum musí však obsahovat chlortetracyklin v takovém množství, aby po naočkování obsahovala půda antibiotikum v bakteriostatické koncentraci. Naše pokusy však ukazují, že ani organismy vůči chlortetracyklinu resistetní (jako kvasinky a ostatní houby) se ve fermentované půdě příliš rychle nepomnožují. Složení půdy užívané pro produkci chlortetracyklinu není výhodné pro růst kvasinek a hub, takže tyto organismy neobstojí v konkurenci s aktinomycetou *S. aureofaciens*, pro jejíž růst a produkci antibiotika je fermentační půda optimální. Zdá se, že volba optimálního složení živné půdy a ostatních biologických podmínek fermentace má rozhodující význam pro dobrý průběh nechráněné fermentace. Při fermentaci spolupůsobí při potlačování růstu kvasinek pravděpodobně také antifungální faktory, jež podle literárních údajů (Martin 1955) produkují různé kmeny *S. aureofaciens* vedle chlortetracyklinu.

Ale i v případech, kdy se kontaminující mikroorganismy během produkce chlortetracyklinu pomnoží, na př. v pokusech se záměrnou kontaminací, sníží se produkce chlortetracyklinu jen tehdy, jestliže cizí mikroorganismus změní vlastnosti fermentační půdy v počátečních hodinách fermentace, jak tomu bylo v našich pokusech s kmeny *Torulopsis*. Některé pokusy nasvědčují tomu, že kontaminující mikroorganismy jsou někdy schopny stimulovat produkci antibiotika. Možnost stimulace bude však nutno prokázat na daleko větším počtu fermentací a bude též třeba objasnit její podstatu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Z uvedených výsledků plyne, že chlortetracyklin není nutno vyrábět za dodržení požadavků asepse. Poloprovozní pokusy jakož i provozní pokusy, o nichž budeme podrobněji referovat v příštím sdělení, ukázaly, že lze vyrábět chlortetracyklin v beztlakových nikoli hermeticky uzavřených nádobách, konstruovaných z levného materiálu, na př. dřeva. Jedním z výsledků této práce bylo vypracovat fermentační výrobu chlortetracyklinu bez dodržení aseptických podmínek a tím umožnit rychlé vyřešení levné výroby technických antibiotik, která má značný hospodářský význam.

Souhrn

Kmen *Streptomyces aureofaciens* Bg., produkující chlortetracyklin, byl kultivován hloubkově v baňkách na třepacím stroji bez dodržení podmínek asepse. Pokud byla půda očkována vegetativním inokulem nejméně 24 hodin starým, obsahujícím minimálně 200 μg/ml chlortetracyklinu, nedocházelo ke kontaminaci kultur a produkce chlortetracyklinu nebyla snížena oproti kontrolní fermentaci při dodržení všech obvyklých podmínek asepse. Záměrná kontaminace bakteriemi, kvasinkami i přírodním materiálem, jako silně znečištěnou říční vodou nebo zeminou, nezpůsobila snížení produkce chlortetracyklinu s výjimkou kvasinek rodu *Torulopsis*. Z kultur kmene *S. aureofaciens* Bg, záměrně kontaminovaných zeminou a říční vodou, byly isolovány gramnegativní tyčinky resistentní vůči chlortetracyklinu, které slabě stimulovaly produkci tohoto antibiotika, když byly naočkovány do půdy současně s produkčním kmenem. Jen kvasinky rodu *Torulopsis* byly při masivní záměrné kontaminaci schopny růst v půdě naočkované kmenem *S. aureofaciens* a snižovaly produkci chlortetracyklinu. Z těchto pokusů plyne, že při fermentační výrobě chlortetracyklinu není třeba zachovávat podmínky asepse.

Literatura

A new antibiotic and process fot the production thereof. Amer. pat. 2,516.080, 1949.

Beesch, S. C., Schull, G. M.: *Fermentation.* Ind. Eng. Chem. 47 : 1857, 1955.

Bunch, R. L., McGuire, J. M.: *Erythromycin and its salts.* Amer. pat. 2,653.899, 1953.

van Dyck, P., de Somer, P.: *Production and extraction methods of aureomycin.* Antib. Chemotherap. 2 : 184, 1952.

Fernandez, H. S.: *Accion de los antisepticos en la fermentation de la penicillina.* An. Inst. Farmacol. Espanol 2 : 225, 1953.

Finn, R. K.: *Agitation-aeration on the laboratory and in industry.* Bact. Rev. 18 : 254, 1954.

Hagihara, A.: *Studies on penicillinase.* Japan J. Antib. 3 : 128, 1950.

Knight, S. G., Frazier, W. C.: *The control of contaminats in penicilin fermentations by antiseptic chemicals* J. Bact. 50 : 505, 1945.

Lee, S. B.: *Fermentation.* Ind. Eng. Chem. 41 : 1868, 1949.

Levine, J.: *The chemical assay of aureomycin.* J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 38 : 473, 1949.

Martin, J. H.: Antibiotics Annual 1954—1955, 1020, 1955.

Niedercorn, J. G.: *Process for producing aureomycin.* Amer. pat. 2,609.329, 1952.

Pollock, M. R.: *Penicillinase adaptation in Bacillus cereus.* J. Exp. Pathol. 33 : 587, 1952.

Rothe, W.: *Zur Kenntnis der Penicillinase.* Pharmazie 5 : 25, 1950.

Silcox, H. E., Lee, S. B.: *Fermentation.* Ind. Eng. Chem. 40 : 1602, 1948.

Vondráčková, J.: *Význam přenosu kysliku pro produkci antibiotik. I. Aplikace siřičitanové metody pro fermentace na třepacích strojích.* Čs. mikrobiol. 2 : 37, 1957.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Новые способы биосинтетического производства антибиотиков. I.

Биосинтез хлортетрациклина без соблюдения асептических условий

Э. Белик, М. Герольд и Ю. Доскочил

Резюме

Глубинная культивация штамма Streptomyces aureofaciens Bg, выделяющего хлортетрациклин, производилась нами в колбах, на качалке, без соблюдения условий асептики. Поскольку применялся вегетативный и не менее, чем 24-часовый посевой материал, содержавший минимум 200 μг/мл хлортетрациклина, заражения культур не наблюдалось, и продукция хлортетрациклина не понижалась в сравнении с контрольной ферментацией, осуществлявшейся при соблюдении всех обычных предосторожностей. Преднамеренное заражение бактериями, дрожжами и естественным материалом, как сильно загрязненная речная вода или почва, не вызывало понижения продукции хлортетрациклина (за исключением дрожжей рода Torulopsis). Из культур S. aureofaciens Bg, преднамеренно зараженных землей и речной водой, нами были изолированы грам-отрицательные палочки, устойчивые к хлортетрациклину, которые незначительно стимулировали продукцию этого антибиотика при посеве в среду одновременно с производственным штаммом. Только дрожжи рода Torulopsis при массивном умышленном заражении бывали способны расти в среде, засеянной штаммом S. aureofaciens, и понижали продукцию хлортетрациклина. Опыты показывают, что при ферментационном производстве хлортетрациклина нет необходимости соблюдать условия асептики.

New Methods of the Biosynthetic Production of Antibiotics. I.

The Biosynthesis of Chlortetracycline without Maintaining Aseptic Conditions

E. Bělík, M. Herold, J. Doskočil

Summary

The strain *Streptomyces aureofaciens* Bg producing chlortetracycline, was grown in submerged cultures in flasks on a shaker, without maintaining aseptic conditions. If the medium was inoculated with a vegetative inoculum at least 24 hours old and containing at least 200 μg./ml. of chlortetracycline, contamination of the cultures did not occur and the production of chlortetracycline was not reduced as compared with control fermentation carried out under the usual conditions of asepsis. Experimental contamination with bacteria, yeasts and natural material such as highly contaminated river water or soil did not cause any reduction in the production of chlortetracycline, with the exception of yeasts of the genus *Torulopsis*. Gram-negative rods resistant to chlortetracycline were isolated from cultures of the strain *S. aureofaciens* Bg contaminated with soil and with river water; these slightly stimulated production of the antibiotic if injected into the medium together with the production strain. Only yeasts of the genus *Torulopsis*, in massive experimental contamination, were capable of growth in a medium inoculated with the strain *S. aureofaciens* and reduced the production of chlortetracycline. These experiments demonstrate that strict observance of asepsis is unnecessary in the fermentation production of chlortetracycline.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Význam přenosu kyslíku pro produkci antibiotik. I.

Aplikace siřičitanové metody pro fermentace na třepacích strojích

JITKA VONDRÁČKOVÁ

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

Ředitel ústavu doc. Ing. M. Herold

Došlo 27. 7. 1956

Při výzkumu fermentace antibiotik jsou pozorovány i při standardisaci fermentačního procesu rozdíly v průběhu fermentací na třepacích strojích a v tanku. Tyto odchylky pramení zřejmě z těch podmínek fermentací, které jsou bezprostředně závislé na fermentační aparatuře. Jednou z těchto odchylek je různý způsob provzdušňování fermentační kapaliny.

Studiu přenosu kyslíku do fermentační kapaliny bylo věnováno mnoho prací, jejichž souhrnný přehled podává Finn (1954). Při studiu fermentace antibiotik věnoval této otázce pozornost jako první Stefaniak a Gailey (1946).

Aby bylo možno porovnat fermentace na třepacích strojích a v tanku, je třeba přesně definovat zejména rozdílnost obou fermentačních zařízení co do různé intensity přenosu kyslíku. Rychlost rozpouštění plynu v kapalině je mimo jiné úměrná styčné ploše plynné a kapalné fáze. U fermentace na třepacích strojích je podporováno rozpouštění kyslíku povrchem fermentačních kapalin jen pohybem kapaliny v baňce. U tankových fermentací se však hladina fermentační kapaliny podílí na zásobování kyslíkem jen minimálně. Hlavního uplatnění tu dochází uměle vytvořená styčná plocha fermentační kapaliny s mechanicky rozptýlenými vzdušnými bublinkami. Je pravděpodobné, že takto vytvořená styčná plocha obou fází je i relativně větší a že tedy rychlost rozpouštění kyslíku je u tankových fermentací také z tohoto důvodu větší. Kritická hodnota hladiny kyslíku v živném mediu, charakteristická pro každý jednotlivý mikroorganismus, je zpravidla poměrně nízká, je jí možno celkem snadno dosáhnout a udržovat. Tato minimální hladina sice určuje normální průběh vývoje produkujícího organismu, nezaručuje však ještě, že jí bylo dosaženo optimálních podmínek pro maximální produkci antibiotika. Výše udržované hladiny kyslíku může alespoň v určitém rozpětí podstatně ovlivňovat výši produkce. I když je třeba brát v úvahu, že tato isolovaná podmínka nemůže být jediným faktorem, je její role při fermentaci velmi závažná.

Velikost styčné plochy plynné a kapalné fáze se nedá měřit přímo. Je však možno stanovit součin styčné plochy obou fází a úhrnné vodivosti plynného a kapalného filmu a mezifází — hodnotu K_La. Tato hodnota závisí na způsobu provzdušňování fermentační kapaliny. Je to charakteristika, která definuje rychlost přenosu kyslíku do kvasné kapaliny a její stanovení umožňuje přesnější porovnání fermentací v různém fermentačním zařízení.

Rychlost absorpce plynu kapalinou je dána rovnicí:

$$\textit{rychlost absorpce} = K_La(C_S - C_L) \qquad (1)$$

kde K_L je celková vodivost, t. j. reciproká hodnota součtu odporů, které musí překonat kyslík na cestě z plynné fáze do kapalné v plynném filmu, mezifází a kapalném filmu; a je povrch styčné plochy kapaliny s plynem; C_S je koncentrace kyslíku v kapalině při vzdušnění vzduchem za stavu nasycení (při teplotě 25 °C je to asi 0,2 mM O_2/lt.); C_L je okamžitá koncentrace kyslíku v kapalině. K_La se udává v mM O_2/l hod. na jednotku koncentračního spádu kyslíku, tedy v l/hod.

Jeden ze způsobů stanovení K_La je založen na sledování průběhu oxydace siřičitanového roztoku na síran za katalytických účinků některých těžkých kovů. V několika intervalech se opakovanou jodometrickou titrací stanoví úbytek siřičitanu, jenž je ekvivalentní rychlosti absorpce kyslíku. Poněvadž

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

oxydace probíhá velmi rychle, je veškerý absorbovaný kyslík prakticky okamžitě spotřebován a hodnota C_L je tedy v každém okamžiku rovna nule. Při siřičitanových pokusech se tedy stanoví přímo součin $K_La\ C_S$. Hodnota C_S je známa a K_La se vypočítá z rovnice (1). Je ovšem třeba mít na zřeteli, že tyto pokusy jsou modelové a nemusí dát zcela přesný obraz vzdušnících poměrů při fermentaci.

Jako katalysátoru při siřičitanové metodě studia přenosu kyslíku do kapaliny se používá nejčastěji dvojmocné mědi (Cooper a sp. 1944, Abel 1951, Chain 1952, Finn 1954), někdy kobaltu (Finn 1954). Rychlost oxydace nezávisí na koncentraci siřičitanových iontů, pokud se pohybuje v rozmezí 0,1 až 1,0 N, přítomnost síranových iontů rovněž rychlost reakce neovlivňuje. Reakce nezávisí ani na koncentraci měďnatých iontů v rozmezí 10^{-8} až 10^{-4}M (Abel 1951). Rovněž vliv teploty v oblasti, přicházející v úvahu při fermentaci, je minimální (Cooper 1944).

Reakce probíhá dostatečně rychle jen ve slabě alkalickém prostředí. Se vzrůstající koncentrací alkálií ubývá na její rychlosti (Miyamoto 1927), zvýšená koncentrace vodíkových iontů stejně jako koncentrace kysličníku uhličitého a křemičitého reakci rovněž brzdí (Abel 1951). Mimo to se nepříznivě uplatňují i různé negativní katalysátory, o nichž se zmiňuje Milbauer (1922) a zevrubně se jimi zabývá Bigelow (1898).

Na první pohled tu jde o velmi jednoduché poměry, ve skutečnosti je však stav značně komplikovanější a průběh oxydace je předmětem četných obsáhlých publikací, které souhrnně zpracovává Abel (1951).

Rozptyl stanovení se uvádí většinou 5 %. Větší rozptyl výsledků pokusů z baněk může být způsoben různou propustností zátek (Yamada a Takahashi 1952).

Při své práci, s níž jsme začali v roce 1954, věnovali jsme se zjištění rychlosti přenosu kyslíku do fermentační kapaliny siřičitanovou metodou za různých podmínek v baňkách na laboratorních třepacích strojích. K těmto pokusům byly za stejných podmínek provedeny paralelně fermentace penicilinu, streptomycinu a chlortetracyklinu pro posouzení vlivu intensity přenosu kyslíku na výši produkce antibiotika.

Materiál a metody

Roztoky. Jako titračních roztoků jsme používali 0,1 N $Na_2S_2O_3$ a 0,1 N I_2. Siřičitan sodný jsme krystalovali podle Bigelowa (1898). Koncentrovaný roztok siřičitanu jsme skladovali v zabroušené láhvi nejdéle 6 dní. Pro stanovení jsme roztok ředili na koncentraci přibližně 0,3 N.

Třepací stroje. Pracovali jsme na reciprokých třepacích strojích o 100 kmitech/min. a rozkmitu 98 mm (A), o 94 kmitech/min. a rozkmitu 96 mm (B), o 96 kmitech/min. a rozkmitu 102 mm (C) a na rotačním třepacím stroji s 250 obr./min. a r = 25 mm (D). Třepací stroje byly umístěny v termostatech o teplotě 25—28 °C.

Stanovení kyslíku siřičitanovou metodou. Používali jsme varných baněk „Sial" o obsahu 500 ml a Erlenmeyerových baněk o obsahu 750 ml, uzavřených zátkami z buničité vaty. Plnění baněk jsme měnili po 20 ml v rozmezí od 40 do 160 ml. Baňky s roztokem siřičitanu jsme temperovali před nasazením pokusu 10 až 15 minut v boxu třepačky. Pro každé stanovení jsme nasazovali 4 baňky paralelně vedle sebe. Vzorky jsme odebírali v 15minutových intervalech po 0,5 ml z každé baňky dvakrát. Konečná hodnota K_La je průměrem všech hodnot z opakovaných serií jednotlivých stanovení.

Pracovní postup fermentačních pokusů. Pro fermentaci penicilinu jsme použili kmenu *Penicillium chrysogenum* 49—133 a fermentačního media typu laktosa-kukuřičný extrakt (Matelová a Nečásek 1956). Fermentační baňky byly očkovány 10 % vegetativního inokula ve stáří 36 hodin, vypěstovaného na půdě typu glukosa-kukuřičný extrakt.

Streptomycin jsme fermentovali s kmenem *Streptomyces griseus* 14/17a na půdě typu laktosa-škrob-kukuřičný extrakt-síran amonný. Pro očkování fermentačních baněk jsme použili 5% vegetativního inokula ve stáří 24 hodin, vypěstovaného na téže půdě.

Chlortetracyklin jsme fermentovali za použití kmenu *Streptomyces aureofaciens* Bg na modifikované půdě van Dyckově a de Somerově (1952) typu sacharosa-sojová mouka. Pro očkování fermentačních baněk jsme používali 5% vegetativního inokula ve stáří 24 hodin, vypěstovaného na téže půdě.

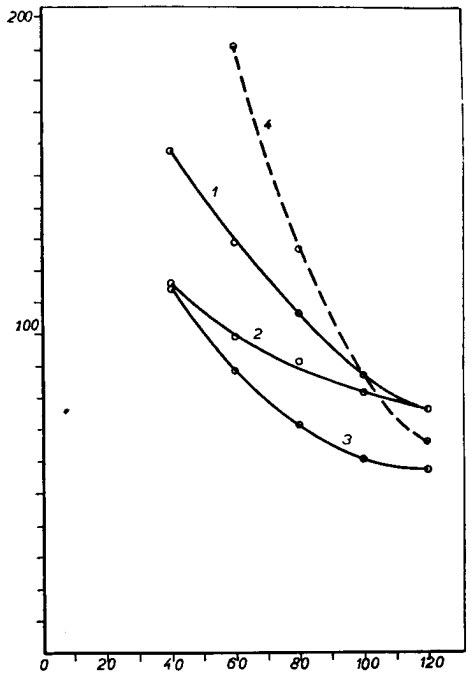
Výsledky a diskuse

Pro zjištění rychlosti přenosu kyslíku se nám nejlépe osvědčil siřičitan čištěný podle Bigelowa. Používá-li se stejně propustných zátek, jsou výsledky opakovaných serií pokusů v dobré vzájemné shodě. Naproti tomu pokusy provedené se siřičitanem různého původu se mohou vzájemně lišit až o 40 %.

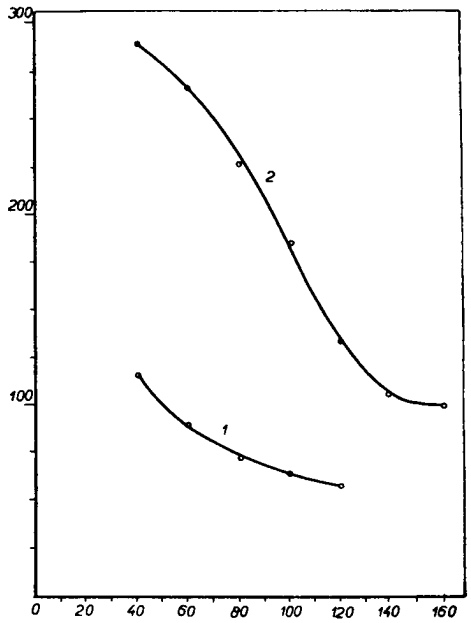
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Obrázek 1 znázorňuje závislost hodnoty K_La na objemu fermentační kapaliny třepané na různých třepacích strojích. Přes to, že reciproké třepací stroje mají téměř shodnou mechanickou charakteristiku, je průběh vzdušnících křivek sice analogický, ale absolutní hodnoty se vzájemně podstatně liší. Je tedy zřejmé, že intensita protřepávání není určena jen rozkyvem třepačky a frekvencí kyvů. Proto také stanovení hodnot K_La u jedné třepačky nemá obecnou platnost i pro ostatní třepací stroje stejného typu a se shodnou mechanickou charakteristikou.



Obr. 1. Závislost hodnoty K_La na objemu třepané kapaliny ve varných baňkách o obsahu 500 ml. Křivky 1, 2, 3 — reciproké třepací stroje A, B, C; 4 — rotační třepací stroj D.



Obr. 2. Závislost hodnoty K_La na objemu třepané kapaliny a tvaru fermentační baňky v pokusech na reciprokém třepacím stroji C. Křivka 1 — varné baňky o obsahu 500 ml; 2 — Erlenmeyerovy baňky o obsahu 750 ml.

Osa x: objemy kapaliny v ml, osa y: hodnoty K_La.

Výše přenosu kyslíku do kapaliny se mění přirozeně podle objemu fermentované kapaliny, závisí však rovněž na tvaru fermentační baňky. Porovnání průběhu přenosu kyslíku ve varných baňkách a Erlenmeyerových baňkách při práci na témže třepacím stroji znázorňuje obrázek 2.

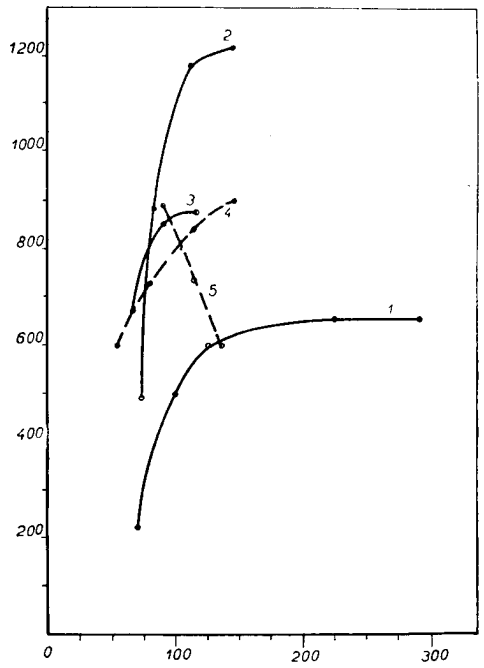
Závislost produkce penicilinu, streptomycinu a chlortetracyklinu na výši přenosu kyslíku znázorňuje obrázek 3. Při fermentaci na reciprokém třepacím stroji je průběh těchto křivek analogický. Se vzrůstajícím přenosem kyslíku roste produkce antibiotika až po určitou hranici, nad ní se další přebytek přenosu kyslíku již podstatně neuplatňuje. Při tom u penicilinu a chlortetracyklinu je organismus citlivější na výši přenosu kyslíku, zatím co u streptomycinu se jeho vliv uplatňuje méně.

Naproti tomu se průběh této závislosti u rotačního třepacího stroje diametrálně liší. U penicilinu jsou rozdíly nejpodstatnější. Při fermentaci na reciprokém třepacím stroji stoupá produkce antibiotika při vzrůstu hodnot K_La od 70 do 100 l/hod. Při

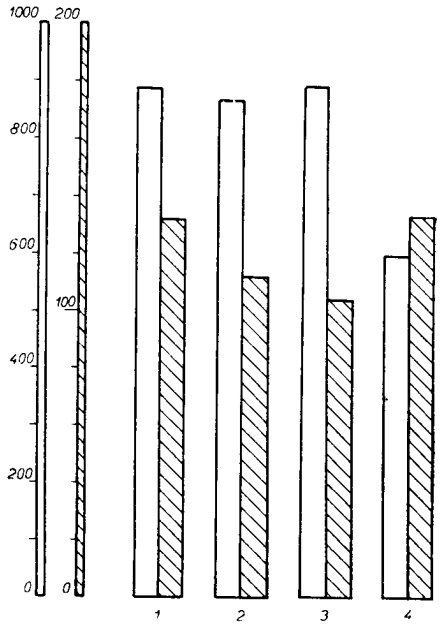
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

dalším zvýšení hodnoty do 130 l/hod. se mění maximum produkce jen nepatrně a má mírně stoupající tendenci. U rotačního třepacího stroje dochází zdánlivě mnohem dříve k uplatnění negativního vlivu „převzdušnění" fermentační kapaliny. V rozsahu hodnot přenosu kyslíku, při nichž dochází u fermentací na reciprokém třepacím stroji ke stabilisaci produkce antibiotika, má na rotačním třepacím stroj zvýšení přenosu kyslíku o 25 % za následek snížení produkce o 30 % (obr. 4).



Obr. 3. Závislost výše produkce antibiotik na hodnotě K_La. Křivka 1 — streptomycin, reciproký třepací stroj C; 2 — penicilin, reciproký třepací stroj C; 3 — chlortetracyklin, reciproký třepací stroj A; 4 — chlortetracyklin, rotační třepací stroj D; 5 — penicilin, rotační třepací stroj D.
Osa x: hodnoty K_La, osa y: produkce antibiotik v m. j./ml.



Obr. 4. Porovnání výše produkce a hodnot K_La u penicilinu. Bílý sloupec: produkce v mj/ml; šrafovaný sloupec: hodnoty K_La. 1, 2 — reciproký třepací stroj C; 3, 4 — rotační třepací stroj D.

Význam sledování přenosu kyslíku siřičitanovými modelovými pokusy pro specifikaci laboratorních fermentačních strojů, případně i pro usnadnění převedení práce z měřítka fermentace laboratorní do měřítka fermentace tankové, je omezen několika činiteli.

Většina autorů, kteří pracují se siřičitanovou metodou, nevěnuje zvláštní pozornost čistotě používaných chemikálií, na niž upozorňuje Bigelow (1898). Chceme-li dosáhnout reprodukovatelných výsledků, je třeba dodržovat jeho připomínky pro používané chemikálie a zátkovat všechny baňky stejně propustnými zátkami.

Mají-li být porovnávány výsledky pokusů, provedené s různými surovinami, je třeba vždy provést jeden srovnávací pokus, který byl zvolen za základ. Je možno porovnávat jen ty serie pokusů, při kterých byly získány stejné výsledky tohoto srovnávacího pokusu. Dále je nutno mít stále na zřeteli, že zjištěná rychlost přenosu kyslíku siřičitanovou metodou má vždy pouze relativní hodnotu vzhledem k odliš-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

ným podmínkám při vlastní submersní kultivaci mikroba. Konečně je třeba uvážit, že při aplikaci výsledků modelových sulfitových pokusů za podmínek laboratorn fermentace pro její převádění do měřítka fermentace tankové se uplatňuje mnoho geometrických, mechanických a funkčních diferencí fermentačních aparatur. Patrně právě proto se shledáváme s tím, že v mnoha případech dosahujeme stejných výtěžků antibiotika při fermentaci tankové i třepačkové, ačkoliv, jak jsme zjistili informativními pokusy, je intensita přenosu kyslíku za vzdušnění a míchání v tanku asi dvakrát až osmkrát vyšší, než v baňce na třepacím stroji (výsledky této práce budou předmětem další publikace).

Mimořádné pozornosti zasluhuje skutečnost, že intensita přenosu kyslíku, dosažená na třepacích strojích v podstatě stejných, s minimálními diferencemi v délce a počtu kyvů, je podstatně odlišná. Je proto zřejmé, že pro specifikaci třepacího stroje nepostačí jeho mechanická charakteristika, stejně jako pro specifikaci přenosu kyslíku v tanku nepostačuje údaj o množství proháněného vzduchu a počtu obrátek michadla. Je však zřejmé, že ani při fermentacích na třepacích strojích, provedených jednotným postupem, není intensita přenosu kyslíku jediným činitelem, který ovlivňuje produkční výši. Je to zřejmé z obr. 3, kdy na rotačním třepacím stroji se stoupajícím přenosem kyslíku, měřeným siřičitanovou metodou, klesá dosažená produkce penicilinu. O povaze vlivů, které to podmiňují, si nelze dosud učinit konkretnější představu. Je možno označit je snad souborně za „mechanické", jejich povaha však může být velmi různá, na př. částečné gravitační rozdělení složek živné půdy a submersní kultury vlivem rotačního pohybu, morfologicky různý způsob růstu mycelia a pod.

Souhrn

Při práci na laboratorních třepacích strojích byla zjišťována intensita přenosu kyslíku do kapalné fáze siřičitanovými modelovými pokusy. Bylo zjištěno, že je závislá nejen na množství tekutiny v baňce, na tvaru baňky a na typu třepacího stroje (reciprokého nebo rotačního), ale že i třepací stroje s nepatrnými diferencemi v mechanické charakteristice podmiňují podstatně při jinak stejných podmínkách odlišné hodnoty K_La.

Zjistili jsme závislost výše produkce penicilinu, streptomycinu a chlortetracyklinu na hodnotách K_La. Pro fermentaci penicilinu na rotačním třepacím stroji jsme zjistili, že při zvětšování přenosu kyslíku v rozmezí hodnoty K_La od 70 do 130 l/hod. se produkce proti očekávání snížila. Vzhledem k tomu, že při fermentaci na třepacích strojích se nemůže jednat o „převzdušnění", nutno zde uvažovat o „mechanických" faktorech, i když o jejich povaze si zatím nelze učinit přesnější představu.

Děkuji V. Matelové, F. Palečkové a E. Bělíkovi za provedení fermentačních pokusů penicilinu, streptomycinu a chlortetracyklinu a E. Kindlové za experimentální pomoc. Rovněž děkuji J. Nečáskovi za zájem o práci a cenné rady.

Literatura

Abel, E.: *Zur Theorie der Oxydation von Sulfit zu Sulfat durch Sauerstoff*. Monatsh. Chem. 82 : 815, 1951.

Bigelow, S. L.: *Katalytische Wirkungen auf die Geschwindigkeit der Oxydation des Natriumsulfits durch den Sauerstoff der Luft*. Zschr. Physik. Chem. 26 : 493, 1898.

Cooper, C. M., Fernstrom, G. A., Miller, S. A.: *Performance of agitated gas-liquid contactors*. Ind. Eng. Chem. 36 : 504, 1944.

Dyck, P. van, de Somer, P.: *Production and extraction methods of aureomycin*. Antib. Chemoth. 2 : 184, 1952.

Finn, R. K.: *Agitation-aeration in the laboratory and in industry*. Bact. Revs. 18 : 254, 1954.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Chain, E. B., Paladino, S., Callow, D. S., Ugolini, F., van der Sluis, J.: *Studies on aeration. I.* Bull. Org. Mond. Santé 6 : 73, 1952.

Matelová, V., Nečásek, J.: *Výzkum fermentačních podmínek pro produkci penicilinu kmenem Penicillium chrysogenum 51—20.* Čs. mikrobiol. 1 : 255, 1956.

Milbauer, J., Pazourek, J.: *L'oxydation des sulfites en solutions concentrées.* Bull. Soc. Chim. France 31 : 676, 1922.

Miyamoto, S.: *The effect of alkali on the oxydation of sodium sulphite with air.* Bull. Chem. Soc. Japan 2 : 74, 1927.

Stefaniak, J. J., Gailey, F. B.: *Pilot plant equipment for submerged production of penicillin.* Ind. Eng. Chem. 38 : 666, 1946.

Yamada, K., Takahashi, J.: *Aerobic fermentation. I. Oxygen absorption velocity in a shaking culture.* J. Agr. Chem. Soc. Japan 26 : 427, 1952, C. A. 48 : 13157a, 1954.

Значение подачи кислорода для продукции антибиотиков. I.

Применение сульфитного метода для ферментации на механических качалках

И. Вондрачкова

Резюме

При работах с лабораторными качалками определялась с помощью моделей опытов с сульфитами интесивность перехода кислорода в жидкую фазу. Было установлено, что она зависит не только от количества жидкости в сосуде, от формы сосуда и от типа сотрясательного механизма, — с вращательным или с переменно-возвратным движением, — но и от незначительных различий механического устройства качалок, вызывающих при прочих равных условиях существенные различия в величинах K_La. Была установлена зависимость размеров продукции пенициллина, стрептомицина и хлортетрациклина от величин K_La. При ферментации пенициллина на вращающихся качалках мы убедились, что при увеличении подачи кислорода в пределах показателей K_La от 70 до 130 l/час продукция вопреки ожиданию упала. Так как при ферментации на механических качалках не может быть речи об «избыточной аэрации», приходится предположить здесь наличие «механических» факторов, хотя об их характере трудно пока составить себе более точное представление.

The Importance of the Transfer of Oxygen for the Production of Antibiotics. I.

The Application of the Sulphite Method for Fermentation on Shaker Apparatuses

J. Vondráčková

Summary

When working with laboratory shaker apparatuses, a study was made of the degree of the transfer of oxygen into the liquid phase in sulphite model experiments. It was found that this did not only depend on the amount of fluid in the flask, the shape of the flask and the type of apparatus (reciprocating or rotary shaker), but also that shaker apparatuses with only very slight differences in mechanism produced substantially different K_La values under conditions which were otherwise the same. A relationship was found between the level of production of penicillin, streptomycin and chlortetracycline and the values of K_La. When fermenting penicillin on a rotary shaker it was found that on increasing the transfer of oxygen within the limits of the value of K_La from 70 to 130 l/hour, production unexpectedly decreased. In view of the fact that in fermentation on shaker apparatuses there can be no question of „over-ventilation" the possibility of „mechanical" factors should be taken into consideration, even though it is not yet possible to form any precise conception of their nature.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Působení mikroorganismů na naftové uhlovodíky

MILAN DOSTÁLEK, MILOSLAV ŠTAUD a ALENA ROSYPALOVÁ

Ústav pro naftový výzkum, Brno

Došlo 16. 3. 1956

Působení mikroorganismů na chemické změny nafty, které je jednou z nejvýznamnějších otázek naftové mikrobiologie, není dosud dostatečně objasněno.

V zásadě dochází při biochemickém rozkladu nafty vždy k oxydaci uhlovodíků. Za aerobních podmínek probíhá oxydace až na kysličník uhličitý a vodu a jako meziprodukty vznikají aldehydy, ketony, a mastné, případně nafténové kyseliny (ZoBell 1950). Současně nastávají také změny ve složení uhlovodíků. ZoBell (1946) uvádí, že při biochemickém rozkladu nafty mohou být štěpným produktem také plynné uhlovodíky, zejména metan. Tauson a Šapiro (1934) studovali chemismus působení ložiskových bakterií na naftu a mazací oleje. Ze svých pozorování usuzují, že mikroorganismy rozkládají především střední frakci naftových uhlovodíků. Z této frakce jsou pak přednostně napadány nenasycené uhlovodíky a teprve po jejich odbourání uhlovodíky nasycené, při čemž vznikají nenasycené uhlovodíky znovu jako meziprodukty rozkladu (sledováno jodové číslo). Appert a Louis (1955) zjistili produkci asfaltenů a pryskyřic při rozkladu nafty. Uspenskij, Gorskaja a Karpova (1947) sledovali působení desulfurikačních bakterií na naftu a dokázali snižování obsahu parafinických uhlovodíků a produkci asfaltenů. Na základě svých pozorování soudí, že působením desulfurikačních bakterií na naftu v ložiskách je možno vysvětlit různý charakter naft, nalézaných v různých hloubkách v téže naftonosné oblasti.

Předkládaná práce přináší výsledky pokusů, v nichž jsme zjišťovali změny v jednotlivých skupinách naftových uhlovodíků při působení mikroorganismů na typické nafty našich naftových ložisek.

Materiál a metody

Bakterie, zvolené k pokusům, náležely do dvou fysiologických skupin, obecně rozšířených v naftových ložiskách: k bakteriím desulfurikačním a denitrifikačním. Kultury obou skupin byly na základě předběžných testů vybrány ze 112 kmenů, isolovaných z naftových vod. Denitrifikační bakterie (70 kmenů) byly isolovány na masopeptonovém agaru a desulfurikační (42 kmenů) v laktátovém živném roztoku. Při předběžných testech jsme u získaných kultur zjišťovali asimilaci naftových uhlovodíků v prostředí minerálního živného roztoku. Na základě těchto testů jsme vybrali tři zástupce denitrifikačních bakterií *(Pseudomonas)* a tři zástupce desulfurikačních bakterií *(Desulfovibrio)*. Druhy jsme neurčovali. Použité kmeny obou skupin asimilovaly naftové uhlovodíky z parafinických i naftenických naft.

Při pokusech, v nichž jsme zjišťovali změny chemického složení nafty působením bakterií, jsme použili minerálního živného roztoku tohoto složení (Bushnell a Haas 1941): KH_2PO_4 0,1 %, $MgSO_4$ 0,02 %, $CaCl_2$ 0,002 %, K_2HPO_4 0,1 %, NH_4NO_3 0,1 %, $FeCl_3$ stopy. pH 7 až 7,2 po sterilisaci. Pro kultivaci desulfurikačních bakterií jsme přidávali 0,2 % Na_2SO_4. Tuhé půdy jsme upravovali přídavkem 2 % promytého agaru. Ke kultivaci za anaerobních podmínek jsme použili válcovitých děliček. Při plnění a výměně živného roztoku jsme udržovali válce šikmo, při kultivaci jsme je ukládali vodorovně, abychom dosáhli maximální styčné plochy mezi naftou a živným roztokem. Do válců jsme vpravovali vždy 40 ml zkoušené nafty a po naočkování jsme doplnili válce po hrdlo živným roztokem (asi 500 ml). Plocha styku živného roztoku a nafty činila asi 82 cm^2. Testování za aerobních podmínek jsme prováděli v Kluyverových nádobách s fritou. Vzdušněno bylo přerušovaně; po 2 hodinách vzdušnění jsme zařazovali čtyřhodinovou přestávku. Poměr množství nafty a živného roztoku byl při těchto pokusech stejný, jako za anaerobních podmínek. Styčná plocha nafty a živného roztoku byla asi 80 cm^2 (při pře-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

rušeném vzdušnění). Kultivováno bylo při 32 °C; po 14 dnech kultivace jsme vyměňovali z 80 % živný roztok. K inokulaci jsme použili kultur v laktátovém živném roztoku, ve stadiu logaritmické fáze růstu. Objem inokula činil 1 % z objemu očkovaného živného roztoku. Vzorky nafty, použité k pokusům, byly sterilisovány frakcionovaně v autoklávu za přetlaku 1 atm.

Vzorky nafty, použité k pokusům, představují základní skupiny naft, těžených v ČSR, totiž naftu parafinickou a nafténickou. Ropa parafinická se vyznačuje velmi nízkou specifickou vahou a poměrně značným obsahem benzinových uhlovodíků, naproti tomu ropa nafténická je značně těžší a prakticky bez lehkých podílů. Rozdíl obsahu uhlovodíkových skupin je patrný z počtu kruhů aromatických (R_A), nafténických (R_N) a celkového počtu kruhů (R_T) v průměrné hypotetické molekule:

	Nafta parafinická	Nafta nafténická
R_A	0,35	0,38
R_N	0,75	2,54
R_T	1,10	3,02

K hodnocení vlivu mikroorganismů na naftu jsme použili analytické metody, označované v literatuře jako metoda n-d-M, a měření viskosity. Metodou n-d-M (Leendertse a sp. 1953) jsme zjišťovali procento uhlíku, vázaného v aromatických (% C_A), nafténických (% C_N) a parafinických (% C_P) uhlovodících. Hodnota % C_R udává celkové množství uhlíku, vázaného v cyklických uhlovodících (% C_A + % C_N). Za parafinické uhlovodíky jsou považovány i boční řetězce na kruhových jádrech. Při výpočtech se v uvedené metodě vychází ze stanovení specifické váhy, indexu lomu (n_d^{20}) a molekulové váhy (kryoskopicky) daného vzorku. Přesnost metody n-d-M stanovili její autoři (Leendertse a sp. 1953) ve srovnání s t. zv. metodou přímou s těmito výsledky: % C_A + 1,0 %; % C_N ± 1,7 %; % C_P ± 1,3 %. Při použití analytické metody n-d-M pro analysu vzorků nafty, ovlivněné činností mikroorganismů, zjistili jsme tyto hodnoty reprodukovatelnosti: % C_A ± 1,5 %; % C_N ± 0,53 %; % C_P ± 0,63 % (4 opakování). Viskositu nafty jsme měřili Ubbelohdeho viskosimetrem. Kysličník uhličitý jsme vytěsnili z nafty varem v prostředí dusíku a stanovili pomocí Orsatova přístroje. Koncentraci kysličníku uhličitého v plynu, nahromaděném v kultivačních nádobách, jsme zjišťovali plynovým chromatografem.

Výsledky

Vztah mikroorganismů k naftovým uhlovodíkům

V této pokusné serii bylo otestováno 112 kultur, isolovaných z naftových ložisek, na schopnost asimilovat naftové uhlovodíky ze 4 typů naft. Působení denitrifikač-

Tab. 1. Asimilace nafty ložiskovými mikroorganismy

Nafta	Intensita růstu	Počet asimilujících kmenů		Kmeny přednostně asimilující
Specifická váha		*Pseudomonas*	*Desulfovibrio*	
Parafinická 0,835	+ + + +	63	38	90 %
Nafténická 0,932	+ + +	9	5	
Nafténická 0,941	+ +	5	5	10 %
Asfaltická 0,983	+	0	1	0

ních bakterií jsme sledovali za aerobních podmínek na minerálním agaru, působen desulfurikačních bakterií za anaerobních podmínek v živném roztoku. Na tuhých půdách jsme hodnotili růst podle vývoje kolonií, v živných roztocích u desulfurikačních bakterií podle tvorby sraženiny sirníku železnatého. Pro posouzení intensity vývoje kultur jsme použili sledování délky lag-fáze. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Působení mikroorganismů na chemické složení nafty a na viskositu

Působení desulfurikačních bakterií jsme sledovali za anaerobních podmínek, působení denitrifikačních bakterií za aerobních podmínek ve vzdušněných kulturách. Výsledky změn chemického složení nafty po působení mikroorganismů jsou uvedeny v tabulkách 2, 3 a 4. Doba inkubace byla u anaerobních kultur 60, u aerobních 30 dní. Při sledování změn viskosity nafty jsme sledovali působení desulfurikačních bakterií za anaerobních podmínek a působení denitrifikačních

Tab. 2. Působení bakterie rodu *Desulfovibrio* (kmen 1) na parafinickou naftu

Doba kultivace ve dnech	Spec. váha	n_D^{20}	M	% C_A	% C_R	% C_N	% C_P
0	0,8342	1,46597	205	14,0	42,0	28,0	58,0
60	0,8395	1,46776	211	13,0	44,5	31,5	55,5

Tab. 3. Působení bakterie rodu *Desulfovibrio* (kmen 1) na nafténickou naftu

Doba kultivace ve dnech	Spec. váha	n_D^{20}	M	% C_A	% C_R	% C_N	% C_P
0	0,9315	1,5065	254	13,0	76,5	63,5	23,5
30	0,9322	1,5073	265	13,8	74,8	61,0	25,2
60	0,9361	1,51123	272	16,3	73,0	56,7	27,0

Tab. 4. Působení kultur rodu *Pseudomonas* na parafinickou naftu
Aerobní podmínky, doba kultivace 30 dní

Kultura	Spec. váha	n_D^{20}	M	% C_A	% C_R	% C_N	% C_P
Kontrola	0,8398	1,46899	227	13,5	38,5	25,0	61,5
1.	0,8528	1,47598	247	15,0	40,5	25,5	59,5
2.	0,8519	1,47557	250	14,5	40,0	25,5	60,0
3.	0,8488	1,47408	244	15,0	41,0	26,0	59,0

Tab. 5. Anaerobní působení mikroorganismů na viskositu nafty

Kultura	Viskosita cSt
Kontrola	115,3 ± 0,3
Desulfovibrio	
kmen 1	112,8 ± 0,3
kmen 2	111,4 ± 0,3
kmen 3	112,4 ± 0,4
Pseudomonas	
kmen 1	112,6 ± 0,3
kmen 2	113,4 ± 0,3
kmen 3	113,6 ± 0,2

Tab. 6. Aerobní působení mikroorganismů na viskositu nafty

Kultura	Viskosita cSt
Kontrola	12,26 ± 0,15
Pseudomonas	
kmen 1	19,26 ± 0,14
kmen 2	24,48 ± 0,24
kmen 3	36,12 ± 0,40

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

bakterií za aerobních podmínek. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky ovlivnění viskosity nafténické nafty oběma skupinami bakterií za anaerobních podmínek. Tabulka 6 obsahuje výsledky působení denitrifikačních bakterií na parafinickou naftu za aerobních podmínek. Změny viskosity jsme měřili po 30 dnech kultivace. Při aerobním působení denitrifikačních bakterií na nafténickou naftu a při působení obou skupin bakterií anaerobně na parafinickou naftu jsme nenaměřili změny. Koncentrace kysličníku uhličitého v naftě se sníženou viskositou se zvýšila v průměru o 0,5 ml na 1 g nafty proti neočkovaným kontrolám. Plyn, nahromaděný v kultivačních nádobách, obsahoval průměrně 6 % CO_2.

Diskuse

První pokusná serie byla věnována zjištění vztahu ložiskových desulfurikačních a denitrifikačních bakterií k základním typům nafty. Výsledky ukázaly, že nejintensivnější růst bakterií obou skupin nastává při asimilaci uhlovodíků z parafinické nafty (tab. 1). 90 % testovaných kmenů bakterií bylo schopno využívat pouze tento typ nafty. Jen u 10 % kmenů byla přednostně asimilována nafta nafténická. U kmenů, které rostly na všech testovaných typech nafty, projevoval se pokles intensity růstu se stoupající specifickou váhou nafty. Asfaltická nafta byla asimilována velmi slabě, a to pouze některými ojedinělými kmeny desulfurikačních bakterií.

Při sledování chemických změn, které nastávají při působení mikroorganismů na naftu, projevily se jako účinné desulfurikační i denitrifikační bakterie. Desulfurikační bakterie vyvolávaly jak u nafty parafinické, tak u nafty nafténické zřetelné zvýšení specifické váhy suroviny. Z tohoto zjištění je zřejmé, že tyto bakterie využívaly především uhlovodíky o nižší molekulové váze.

V případě nafty byly rozkládány především nižší kapalné uhlovodíky parafinické (tab. 2), které jsou ve studované surovině v dostatečném množství. Současné zvýšení obsahu nafténických uhlovodíků není možno na základě provedených pokusů s konečnou platností vysvětlit. Přichází zde v úvahu možnost relativního zvýšení, způsobeného mineralisováním parafinických uhlovodíků bez skutečné produkce nových nafténických uhlovodíků, stejně jako možnost transformace parafinických molekul a řetězců na molekuly nafténické. V případě zvýšení obsahu aromatických uhlovodíků, které je poměrně malé, je možno počítat asi pouze s první eventualitou, totiž s relativním zvýšením.

Při působení desulfurikačních bakterií na nafténickou naftu se projevil při současném zvýšení specifické váhy úbytek nafténických uhlovodíků (tab. 3). Toto pozorování nasvědčuje tomu, že zde byly přednostně odbourávány nižší uhlovodíky nafténické. Za těchto okolností vyplývá tedy z výsledků pokusů, že desulfurikační bakterie napadaly přednostně uhlovodíky o nižší molekulové váze, a to bez ohledu na to, zda se jedná o uhlovodíky parafinické nebo nafténické.

Sledování aerobního působení mikroorganismů na naftu ukázalo, obdobně jako za podmínek anaerobních, zvýšení specifické váhy nafty. Docházelo zde tedy rovněž k odbourávání uhlovodíků o nižší molekulové váze (tab. 4). Absolutní hodnoty rozdílu mezi výchozí a konečnou specifickou váhou byly za aerobních podmínek vyšší než za podmínek anaerobních přesto, že doba trvání anaerobního pokusu byla dvojnásobná. Toto pozorování by svědčilo o tom, že proces rozkladu uhlovodíků v parafinické naftě probíhá intensivněji při aerobním působení denitrifikačních bakterií než při působení desulfurikačních bakterií za anaerobních podmínek. Menší rozdíly v procentuálním zastoupení parafinických a nafténických uhlovodíků po aerobním působení mikroorganismů je možno vysvětlit tím, že za těchto podmínek docházelo k odbourávání lehkých uhlovodíků parafinických i nafténických. Pře-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

vahu mělo ovšem i v tomto případě odbourávání lehkých uhlovodíků parafinických. Z tohoto zjištění je zřejmé, že celkový směr při změnách chemického složení nafty za aerobních i anaerobních podmínek je stejný. Přednostně jsou odbourávány nižší parafinické uhlovodíky a procento uhlovodíků cyklických relativně stoupá.

Při orientačním sledování změn viskosity nafty, vystavené působení mikroorganismů, jsme došli k positivním výsledkům při ovlivnění nafténické nafty za anaerobních podmínek a parafinické nafty za aerobních podmínek. Viskosita nafténické nafty se za anaerobních podmínek vždy snížila, jako při působení desulfurikačních bakterií (tab. 5).

Snížení viskosity zdá se zde protismyslné, neboť specifická váha nafty současně stoupala (tab. 2, 3). Vysvětlení pro klesání viskosity není zde proto možno hledat ve změnách chemického složení nafty, ale spíše v rozpouštění produkovaného kysličníku uhličitého v naftě. Za podmínek aerobních docházelo ke zjevu opačnému. Viskosita parafinické nafty při působení denitrifikačních bakterií stoupala (tab. 6). Tento úkaz je možno vysvětlit zvýšenou produkcí asfalténů a smůl, pro jejichž vznik jsou dány dobré předpoklady při intensivním provzdušňování nafty (Uspenskij, Gorskaja a Karpova 1947). Při kultivaci za aerobních podmínek nemohlo také docházet k rozpouštění kysličníku uhličitého, který byl v průběhu vzdušnění vytěsňován.

Výsledky našich pokusů ukazují, že při působení mikroorganismů na základní typy československých naft jsou přednostně odbourávány uhlovodíky o nižší molekulové váze, a to jak uhlovodíky parafinické, tak uhlovodíky nafténické. Na základě provedených orientačních pozorování chemismu rozkladného procesu není možno rozhodnout, který z obou druhů uhlovodíků je pro mikroorganismy lepším zdrojem uhlíku a energie. Podle sledování délky lag-fáze testovaných kultur je však možno považovat parafinickou naftu za lépe asimilovatelnou než naftu nafténickou. S hlediska praktické aplikace jsou ze získaných výsledků důležitá zejména zjištění, že základní typy našich naft jsou rozkládány za anaerobních podmínek ložiskovými bakteriemi. Při tomto procesu se mění specifická váha nafty, obsah parafinických i nafténických uhlovodíků a klesá viskosita suroviny.

Souhrn

Studovali jsme působení ložiskových desulfurikačních a denitrifikačních bakterií na parafinickou a nafténickou naftu. Dosáhli jsme těchto výsledků:

1. Za aerobníccch podmínek asimilovalo 90 % testovaných kmenů přednostně parafinickou naftu, 10 % nafténickou naftu. Intensita růstu se snižovala se stoupáním specifické váhy nafty.
2. Při působení bakterií na parafinickou naftu byly odbourávány parafinické uhlovodíky, při působení na nafténickou naftu uhlovodíky nafténické. U obou druhů naft byly přednostně rozkládány uhlovodíky o nižší molekulové váze.
3. Viskosita nafty se snižovala za anaerobních podmínek, za aerobních se zvyšovala.

Literatura

Appert, J., Louis, M.: *Note sur l'attaque des pétroles par les microorganismes.* Rev. Inst. Franc. Pétrol 10 : 345, 1955.

Bushnell, L. D., Haas, H. F.: *The utilisation of certain hydrocarbons by microorganisms.* J. Bact. 41 : 653, 1941.

Leendertse, J. J., Tadema, H. J., Smittenberg, J., Vlugter, J. C., Waterman, H. I., Westen, H. A. van, Nes, K. van: *Strukturgruppenanalyse von Erdölfraktionen nach der n-d-M Methode.* Erdöl u. Kohle 6 : 537, 1953.

Tauson, V. O., Šapiro, S. L.: *Obščeje napravlenije okislenija nefti bakterijami.* Mikrobiologija 3 : 79, 1934.

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

ZoBell, C. E.: *Action of microorganisms on hydrocarbons.* Bact. Rev. 10 : 1, 1946.

ZoBell, C. E.: *Assimilation of hydrocarbons by microorganisms.* Adv. Enzymol. 10 : 443, 1950.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Воздействие микроорганизмов на углеводороды нефти

М. Досталек, М. Штауд и А. Росыпалова

Резюме

Иследовалось воздействие сульфатвосстанавливающих и денитрифицирующих бактерий нефтяных месторождений на основные типы чехословацкой нефти (парафинистую и нафтеновую). При аэробных условиях 90% исследуемых штаммов использовало преимущественно парафинистую, а 10% — нафтеновую нефть. С повышением удельного веса нефти интенсивность размножения бактерий понижалась. У парафинистой нефти бактерии разлагали преимущественно парафиновые углеводороды, тогда как у нафтеновой — нафтеновые углеводороды. У обоих типов нефти прежде всего разрушались углеводороды с низким молекулярным весом. При анаэробных условиях вязкость нефти уменьшалась, а при аэробных увеличивалась. Произведенные работы представляют начало дальнейших, более подробных исследований воздействия микроорганизмов на нефть и возможности использовать это воздействие при добыче нефти.

The Effect of Micro-organisms on Petroleum Hydrocarbons

M. Dostálek, M. Štaud and A. Rosypalová

Summary

A study was made of the action of desulphurizing and denitrifying bacteria from oil-well water on paraffinic and naphthenic oils. Under aerobic conditions, 90% of the strains tested preferentially assimilated paraffinic oil and 10% naphthenic oil. The higher the specific weight of the oil, the lower the degree of growth. In the action of the bacteria on paraffinic oil, the paraffinic hydrocarbons are split up and in their action on naphthenic oil, the naphthenic hydrocarbons are split up. In both types of oil, the most intensive decomposition occurred in hydrocarbons with a low molecular weight. Under anaerobic conditions, the viscosity of the oil diminished, under aerobic conditions it increased. This work constitutes the starting-point for a detailed study of the effect of microorganisms on petroleum and for the study of the utilization of this process in the recovery of oil.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

K otázke štruktúry vírusu mozaiky tabaku

VOJTECH BYSTRICKÝ

Virologický ústav, Československá akadémia vied, Bratislava

Došlo 17. 7. 1956

Je snahou početných pracovníkov odhaľovať štruktúru paličiek vírusu mozaiky tabaku (v ďalšom VTM).

Elektrónovým mikroskopom skúmal VTM napr. Williams (1952), ktorý na povrchu častíc pokovevených uránom nenachádza žiadnu štruktúru. Domnieva sa, že sa mu podarilo po pôsobení ultrazvuku na VTM pozorovať odštiepky, dostičky šesťuholníkového tvaru a uzatvára, že palička VTM má tvar šesťstranného hranola. Naproti tomu Johnson (1951) opisuje pravidelnú „perličkovitú" (beaded-chains) štruktúru častíc VTM; špirálovitú štruktúru povrchu častíc VTM pozorovali tiež Köhler a Bode (1951). Schramm (1955) pozoroval v alkalickom prostredí rozpad častíc VTM až na tenké kotúče priemeru 150 Å, hrúbky 50 až 100 Å, ktoré mali uprostred otvor priemeru asi 34 Å. Na elektrónových mikrofotografiách sa mu podarilo tiež zachytiť asi 34 Å hrubé vlákna ribonukleínovej kyseliny. Domnieva sa, že pozorované štepy sú u intaktných častíc navlečené cez otvor na vlákno ribonukleínovej kyseliny. Vychádzajúc mimo iných napr. z prác Herčíka (1953) o rozvoľnení štruktúry bakteriofága pôsobením vhodných látok povrchove aktívnych, Suchov (1953) sa domnieva, že sa mu podarilo pôsobením etylalkoholu na častice VTM zviditeľniť ich špirálovitú štruktúru.

Rozborom difrakčných obrazcov roentgenových lúčov študujú štruktúru VTM Watson (1954) a Franklin a Klug (1955). Dokazujú, že hlavná bielkovinná reťaz VTM je skrutkovite zvinutá okolo hlavnej osi. Bielkovinné subjednotky sú usporiadané tak, že pri stúpaní závitu 23 Å sa opakuje identická časť obsahujúca 31 subjednotiek po 68 Å, t. j. po troch závitoch. Posledne menovaní autori (Franklin a Klug 1956) skúmajú na základe podrobného rozboru roentgenových difrakčných obrazcov u VTM vo vysušenom a v gelovitom stave povrchovú štruktúru častíc. Prichádzajú k záveru, že na povrchu častíc VTM je žliabok (a jemu zodpovedajúca hrana), točiaci se okolo povrchu častice v podobe závitu zhodne so špirálou hlavného bielkovinného reťazca, teda stúpaním 23 Å. Hĺbka závitu je asi 30 Å. Model takýchto častíc ukazuje, že táto štruktúra povrchu umožňuje, aby častice vedľa seba sa nachádzajúce svojimi povrchovými závitmi úzko k sebe prilnuli a vytvorili tak vlastne pravý kryštalický útvar. O hrane závitu sa autori domnievajú, že nie je súvislá, ale že je vytvorená radom vedľa seba ležiacich výbežkov, pochádzajúcich zo subjednotiek hlavného zvinutého reťazca.

Nadväzujúc na uvedené práce Herčíka (1953) a Suchova (1953), chceli sme sa pokúsiť rozvoľniť štruktúru paličiek VTM pôsobením vhodných chemikálií a takto rozvoľnenú štruktúru znázorniť elektrónovým mikroskopom, pričom nám vtedy ešte neboli známe práce Franklina a Klúga z roku 1956.

Materiál a metódy

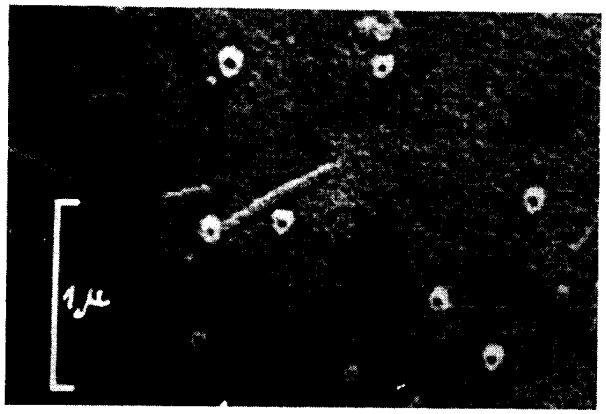
Na prácu sme použili purifikát vírusu mozaiky tabaku, ktorý sme pripravili kombinovanou technikou purifikácie zrážaním síranom ammónym a supercentrifugovaním. Preparáty sme pripravili tak, že po určitej dobe pôsobenia etylalkoholu, prípadne inej látky za určitej teploty na vírus sa vzorka riedila redestilovanou vodou a ako mikrokvapka sa naniesla na kolódiovú blanu. Po zaschnutí sa preparáty šikmo pokovili chrómom a pozorovali v elektrónovom mikroskope Siegbahn-Schönander.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Výsledky a diskusia

Predbežné pokusy za použitia acetónu, éteru, etylalkoholu a močoviny pri izbovej teplote nepriniesli podstatnejšie zmeny štruktúry častíc, i keď sme v niektorých preparátoch zaznamenali čiastočné zväčšenie, „bobtnanie" paličiek účinkom acetónu a etylalkoholu. Výsledky, ktoré predkladáme, sme potom dosiahli pôsobením etylalkoholu (koncentrovaný purifikát VTM plus etylalkohol v pomere 1 : 1), a to pri zvýšenej teplote 37 °C. Obr. 1 predstavuje purifikát VTM, ktorý ihneď po pridaní alkoholu bol destilovanou vodou zriedený na vhodnú koncentráciu a nanesený na kolódiovú blanu. Paličky VTM sú ešte nie zmenené. Treba poukázať na to, že v tesnom susedstve poniektorých paličiek sú menšie zhluky drobných guľatých častíc (obr. 2). Myslíme, že ide o nevírusové bielkoviny adsorbované z prostredia, ktoré sa uvoľnili z povrchu častíc VTM. Veľkosť týchto drobných guľôčok môžeme odhadovať na niekoľko desiatok Å. Po 24hodinovom pôsobení etylalkoholu pri 37 °C



Obr. 7. Purifikát vírusu tabakovej mozaiky, obojstranne pokovený chrómom.

nebadať ešte podstatnejšie zmeny, i keď počet malých odštepkov sa podstatne zvýšil (obr. 3). Medzi paličkami VTM badať predtým opísané drobné guľôčky, ktoré sa azda účinkom etylalkoholu zväčšili. Ďalší obraz (obr. 4) ukazuje preparát po 48hodinovom účinkovaní etylalkoholu pri 37 °C. Na mnohých paličkách je zreteľne vidieť zväčšenie objemu a rozpad na globule. Možno pozorovať rozličné štádiá. Zjavne účinok alkoholu nie je na všetky častice rovnomerný. U niektorých sa len zväčšil objem a pritom sa objavila pravidelná povrchová štruktúra, pásy (obr. 4a), inde vidieť pokročilejšie štádium účinku (obr. 4b). Miestami nastal úplný rozpad na pomerne veľké guľaté útvary. Miesta medzi paličkami VTM sú pokryté veľkým množstvom globulárneho materiálu rozličnej veľkosti.

V ďalšej sérii pokusov sme zistili, že tiež v kontrolnom preparáte, bez alkoholu, teda len vystavenom vplyvu zvýšenej teploty, za 44 hodín pri 37 °C nastali markantné zmeny: lineárne, vyše trojnásobné zväčšenie paličiek, pričom sa objevila zreteľná, viac-menej pravidelná zvlnená štruktúra okrajov, čo svedčí o nerovnomernom „bobtnaní" do šírky. Obr. 5 ukazuje 44 hodinové pôsobenie alkoholu pri 37 °C a obr. 6 ukazuje účinok len vody za 44hod. tiež pri 37 °C. V posledne uvedenom preparáte sme videli rozpad na drobné guľaté častice, ktoré vykazujú uprostred tmavšie miesto, prestavujúce možno otvor. „Nabobtnané" paličky (obr. 5 a 6) vykazujú

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

pozdĺž ich hlavnej osi zreteľne tmavší pás. Ťažko posúdiť, koľko tohto javu možno prisúdiť vlastnej štruktúre častíc. Bolo by možné sa domnievať, že centrálne partie pôvodných častíc sú vyplnené menej hustou hmotou alebo sú i prázdne, čo sa potom u „nabobtnaných" častíc zvlášť výrazne prejaví. V purifikáte VTM, ktorý stál dlhšiu dobu v chladničke zriedený vodou, sme po obojstrannom pokovení preparátu našli odštiepky rozličnej veľkosti, ktoré vykazujú centrálne otvory (obr. 7). Treba podotknúť, že sa nám zatiaľ v žiadnom preparáte nepodarilo pozorovať v literatúre opisované (Schramm 1955) vlákna ribonukleínovej kyseliny. Na doplnenie opísaného uvádzame ešte snímku vysokočisteného purifikátu VTM (obr. 8). Preparát bol riedený destilovanou vodou a ihneď nanesený na kolódiovú blanu. Častice nevykazujú žiadnu štruktúru.

Domnievame sa, že sa nám podarilo pôsobením etylalkoholu na paličky VTM pri zvýšenej teplote ukázať, že sú nerovnomerne prístupné účinku „bobtnania", čo sa prejavuje zviditeľnením vlastnej štruktúry paličiek. Ak si premeriame šírku zväčšených častíc na obr. 4, dostaneme hodnotu asi 700 Å. Táto hodnota je oproti známej hrúbke paličiek VTM 150 Å asi 4,5krát väčšia. Rozdiel treba zrejme pripísať vplyvu alkoholu a vplyvu pokovenia. Zviditeľnené pásy (obr. 4a) sú široké asi 100 Å. Ak súdime, že i táto hodnota je oproti skutočnosti asi 4,5krát väčšia (i keď v smere hlavnej osi paličky bude účinok alkoholu a vplyv pokovenia iný), vychádza nám pre tieto pásy hodnota asi 22 Å. Je preto možné, že sa nám podarilo priamo znázoniť závity na povrchu paličiek VTM, ktoré röntgenovou difrakčnou analýzou nepriamo dokázali Franklin a Klug (1956). Nepravidelné výbežky po stranách paličiek VTM (obr. 5 a 6) by mohli — niekoľkonásobne zväčšené účinkom alkoholu, vody a tepla — predstavovať na pokusné podmienky nerovnako reagujúce časti subjednotiek hlavného zvinutého bielkovinného reťazca, z ktorých sa podľa Franklina a Kluga skladá hrana závitu na povrchu paličiek VTM. Uprostred paličiek v smere hlavnej osi zreteľne viditeľný pás a okrúhle častice s centrálnym otvorom predstavujú azda tiež reálne existujúce štruktúry paličiek. Približným zmeraním (presné merianie nie je možné) veľkosti otvorov v odštiepkoch a pozdĺžneho pásu na snímkach 5 a 6 vychádzajú hodnoty, ktoré sa pohybujú od niekoľko desiatok až po asi 200 Å. Vidieť, že odštiepky a paličky VTM nepravidelne, nerovnomerne odpovedali na účinok zvýšenej teploty a alkoholu. Jednako myslíme, že tieto štruktúry možno hodnotiť ako dôkaz že i pôvodné, nezmenené častice sú uprostred duté, ako uvádza napr. Caspar (1956), ktorý vyhodnocovaním ekvatoriálneho rozptylu röntgenových lúčov orientovaným gélom VTM a vypočtom hustoty elektrónov zistil, že pozdĺž paličiek VTM je dutý priestor o priemere 19 Å.

Súhrn

Elektrónovým mikroskopom boli znázornené paličky vírusu mozaiky tabaku, ktoré boli až 48 hodín vystavené účinku etylalkoholu a zvýšenej teploty 37 °C. Na paličkách, niekoľkonásobne zväčšených účinkom alkoholu a teploty, sa podarilo znázorniť povrchovú štruktúru, pravidelné pásy, ktoré považujeme za totožné s povrchovou štruktúrou zistenou röntgenovou difrakciou na paličkách VTM Franklinom a Klugom. V preparátoch vystavených účinku alkoholu ako aj v takých, kde iba destilovaná voda účinkovala 44 hod., boli nájdené paličky VTM zo zreteľnou vnútornou štruktúrou, pri ktorej azda ide o vnútornú dutú časť paličiek VTM.

Za dodanie purifikovaných vzoriek vírusu autor ďakuje pracovníkom ústavu inž. F. Sokolovi a inž. G. Ruttkayovi-Nedeckému.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Literatúra

Caspar, D. L. D.: *Structure of tobacco mosaic virus.* Nature 177 : 928, 1956.
Franklin, R. E., Klug, A.: *The splitting of layer-lines in X-ray fibre diagrams of helical structures: application to tobacco mosaic virus.* Acta Cryst. 8 : 777, 1955.
Franklin, R. E., Klug, A.: *The nature of the helical groove on the tobacco mosaic virus particles. X-ray diffraction studies.* Biochim. Biophys. Acta 19 : 403, 1956.
Herčík, F.: *Problém bakteriofága.* Praha 1953.
Johnson, J.: *Virus particles in various plant species and tissues.* Phytopathol. 41 : 78, 1951.
Köhler, E., Bode, O.: *Elektronenmikroskopische Untersuchung des Tabakmosaikvirus.* Naturwiss. 38 : 431, 1951.
Schramm, G.: *Über die Struktur des Tabakmosaikvirus. III. Der Zerfall in alkalischer Lösung.* Z. Naturforsch. 10b : 481, 1955.
Suchov, K. S., Nikiforova, G. S.: *O spiralevidnom strojeniji častic virusa mozaiki tabaka.* DAN SSSR 90 : 671, 1953.
Watson, J. D.: *The structure of tobacco mosaic virus. I. X-ray evidence of a helical arrangement of subunits around the long-axis.* Biochim. Biophys. Acta 13 : 10, 1954.
Williams, R. C.: *High-resolution electron microscopy of the particles of tobacco mosaic virus.* Biochim. Biophys. Acta 8 : 227, 1952.

К вопросу структуры вируса табачной мозаики

В. Быстрицкий

Резюме

С помощью электронного микроскопа стали наглядно видимыми палочки вируса табачной мозаики (ВТМ), подвергавшиеся до 48 часов действию этилового спирта и температуры в 37 °С. На палочках, увеличившихся в несколько раз под влиянием спирта и повышенной температуры, удалось сделать доступной осмотру структуру их поверхности, — правильные полосы, которые автор считает тождественными со структурой поверхности палочек ВТМ, определенной с помощью рентгеновской диффракции Franklin-ом и Klug-ом. В препаратах, подвергавшихся действию спирта, да и в таких, на которые действовала в течение 44 часов только дестиллированная вода, были найдены палочки ВТМ с отчетливо видимой внутренней структурой. Как кажется, можно говорить о внутренней полости в палочках ВТМ.

On the Structure of the Tobacco Mosaic Virus

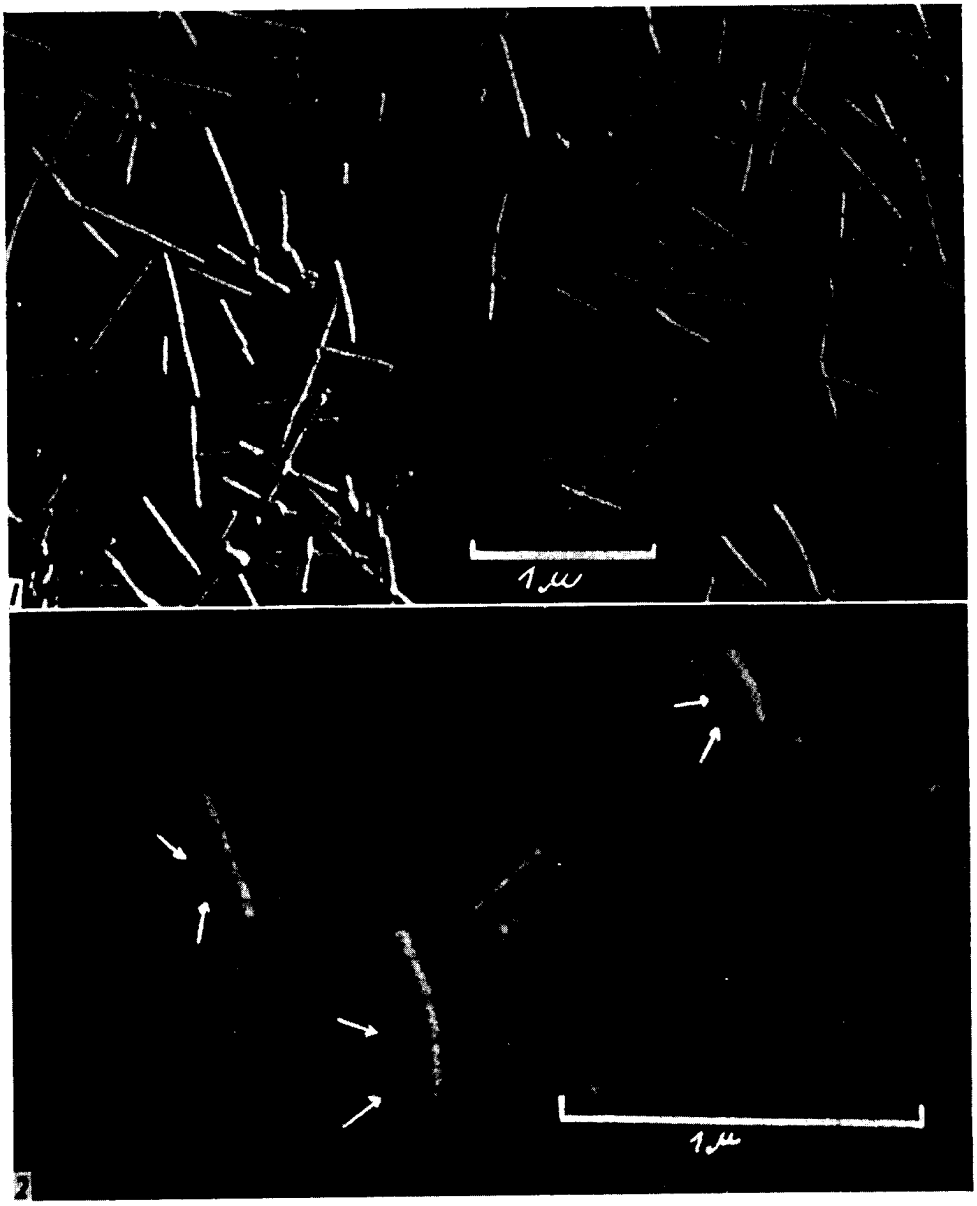
V. Bystrický

Summary

Electron micrographs of rods of the tobacco mosaic virus which had been exposed for 48 hours to the action of ethylalcohol and a raised temperature of 37° C are presented. On the surface of the rods, several times enlarged by the action of ethylalcohol and heat, regular bands have been revealed. These structures are considered to be identical with the surface structure detected by Franklin and Klug by means of X-ray diffraction on rods of the TMV. In preparations exposed to the action of ethylalcohol and others exposed only to the action of distilled water at 37° C for 44 hours, rods of TMV with a distinguishable structure were found, probably showing their hollow internal parts.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

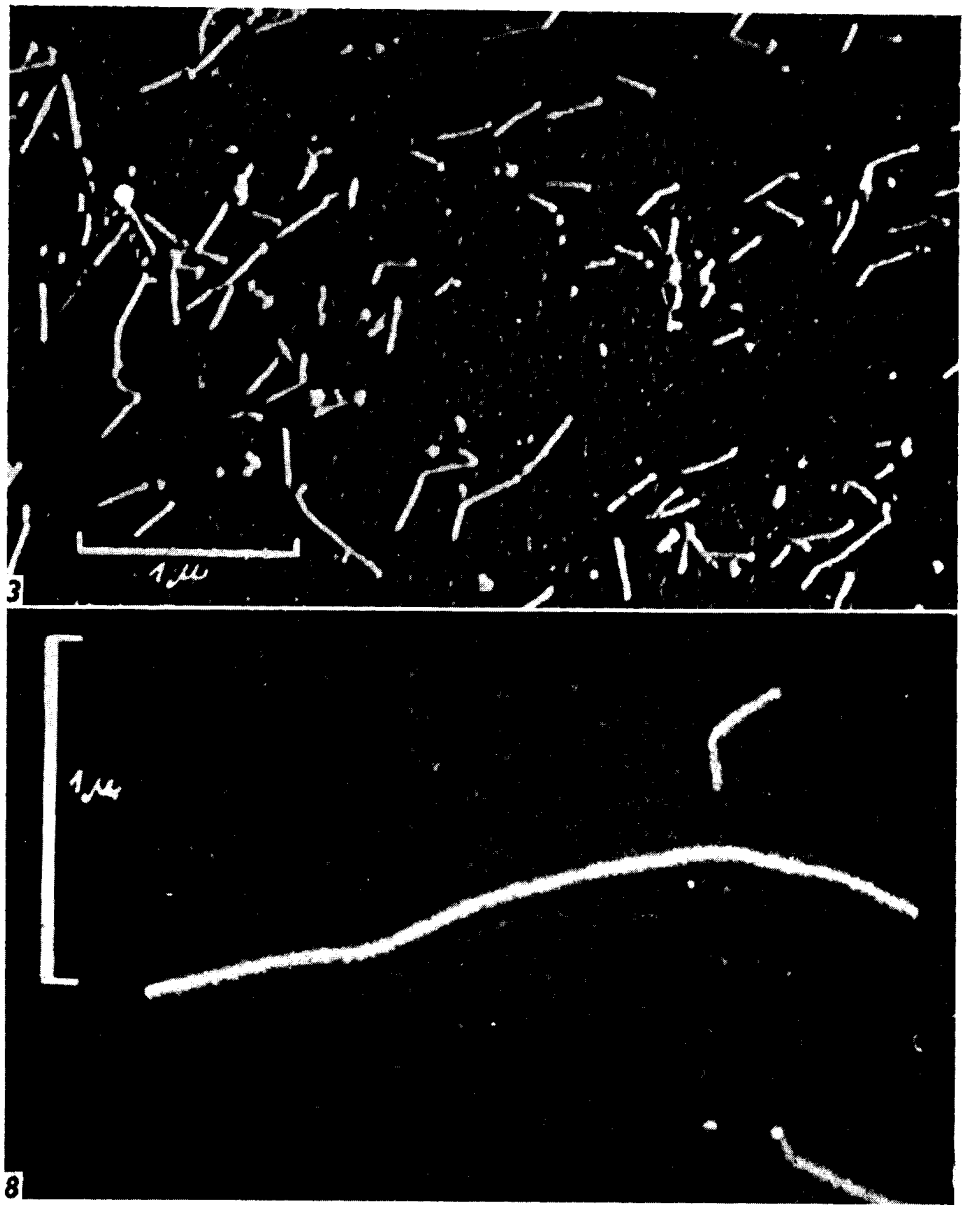


Obr. 1. Purifikát vírusu tabakovej mozaiky ihneď po pridaní alkoholu zriedený redestilovanou vodou a nanesený na blanu.

Obr. 2. Purifikát vírusu mozaikovej choroby tabaku ako obr. 1. Uvoľnenie balastných bielkovín z povrchu paličiek.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

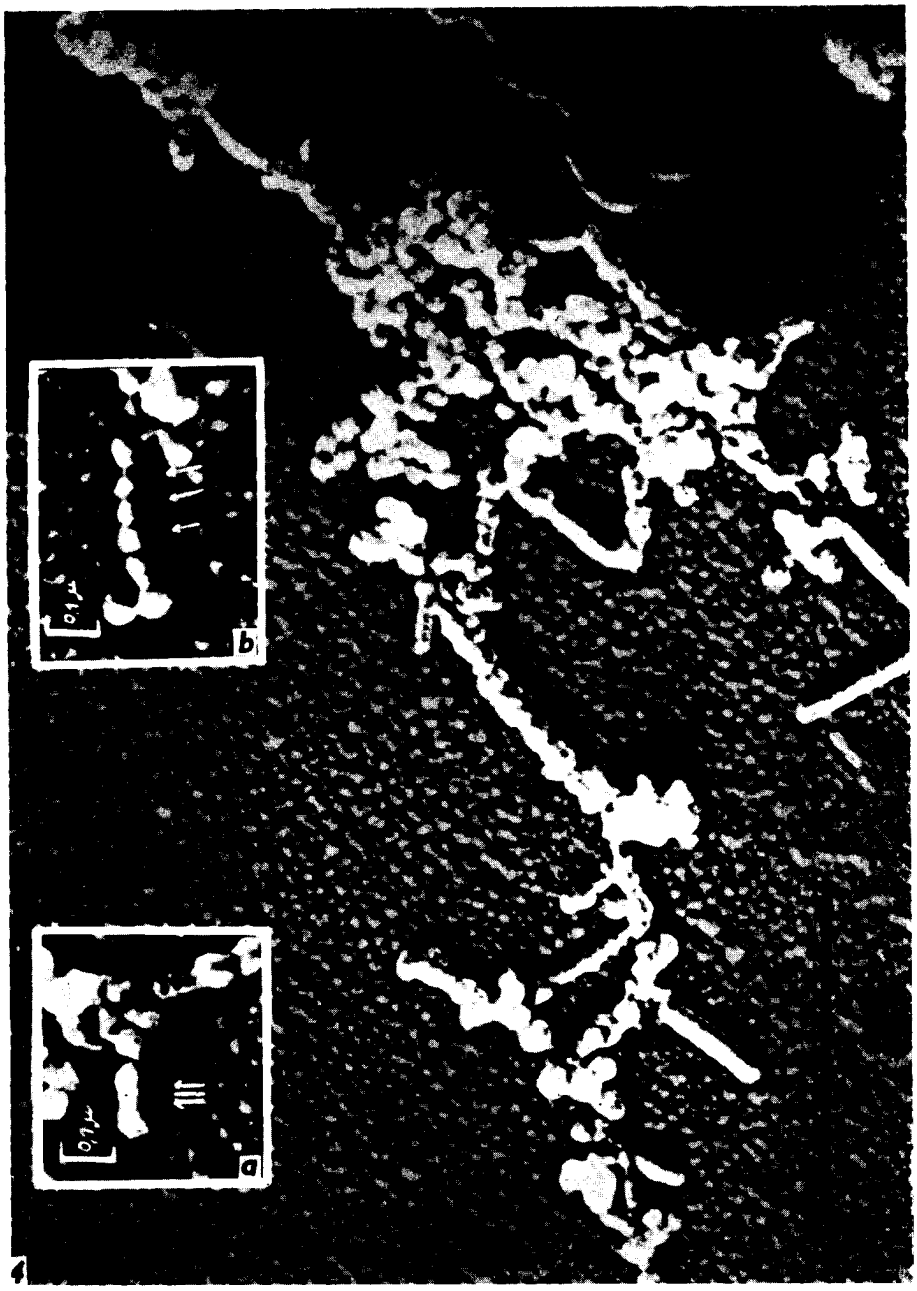


Obr. 3. Purifikát vírusu tabakovej mozaiky po 24hod. pôsobení etylalkoholu pri 37 °C.

Obr. 8. Snímka paličky vírusu tabakovej mozaiky z kontrolného preparátu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

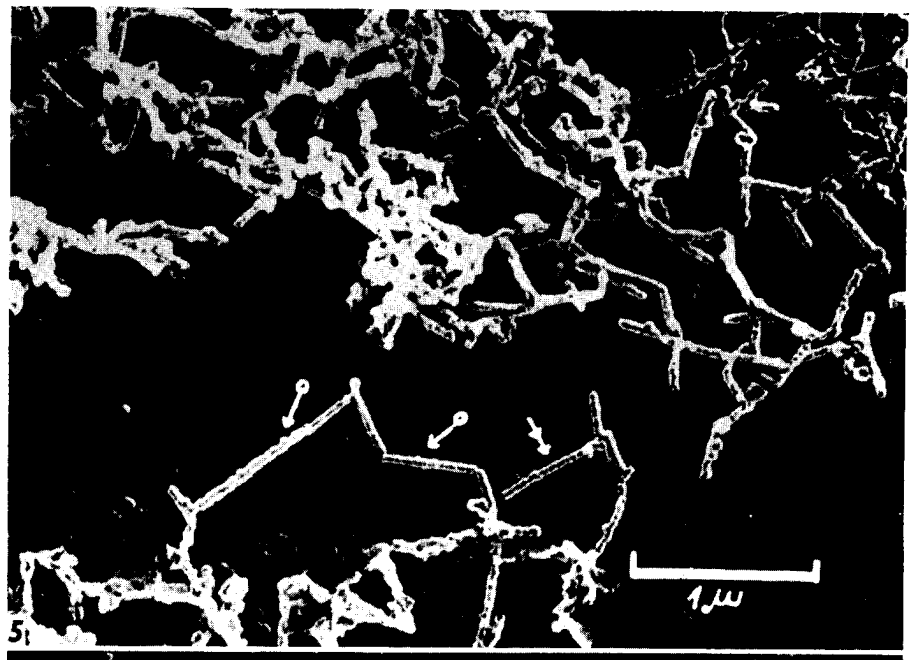
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

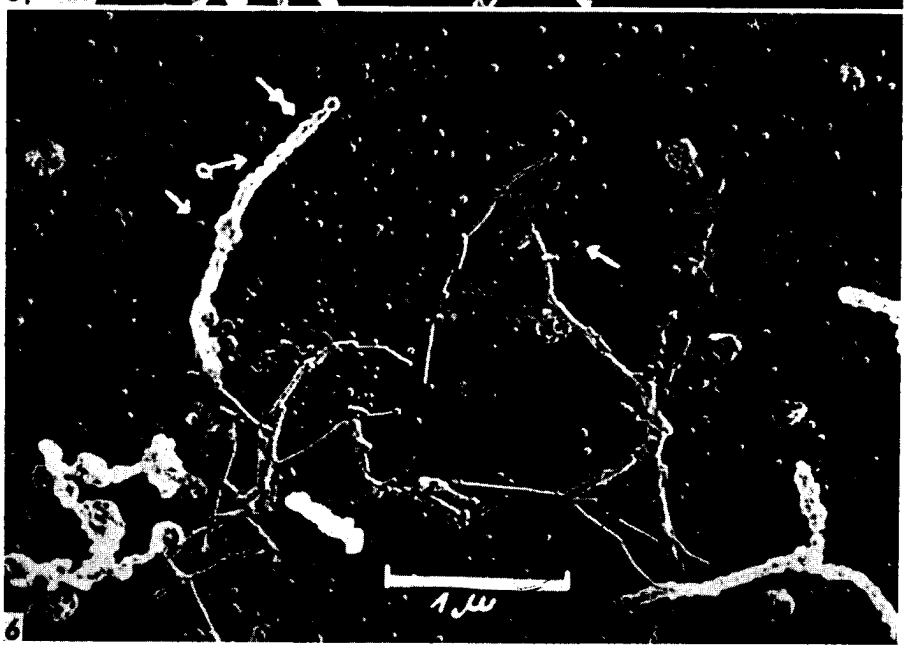


Obr. 4. Purifikát vírusu tabakovej mozaiky po 48hod. pôsobení etylalkoholu pri 37 °C.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8





Obr. 5. 44hodinové pôsobenie etylalkoholu na purifikát vírusu tabakovej mozaiky pri 37 °C.

Obr. 6. Purifikát vírusu mozaiky tabaku riedený redestilovanou vodou a vystavený 44hod. účinku teploty 37 °C. Jednoduché šipky označujú odštiepky s centrálnym otvorom. Miesta označené šipkou (o→) vykazujú nepravidelné „bobtnanie" okrajov paličiek. Paličky vykazujú vnútorný pás (dvojitá šipka).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 1

Zjišťování antimikrobního účinku antibiotik na agarových plotnách

VLADIMÍR ŠEVČÍK a MARTA KYSELOVÁ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 11. 5. 1956

Účinek nových antibiotik na různé mikroorganismy můžeme sledovat zřeďovacími titracemi v tekutých půdách nebo na agarových plotnách. Pro testování nových antibiotik na agarových plotnách vypracovali Waksman a Reilly (1945) t. zv. metodu kvantitativních čárových testů, kdy do agarové půdy na Petriho miskách přidávají různé množství roztoku antibiotika, filtrátu kultury a pod. Na povrch agarové půdy očkují různé testovací mikroorganismy a účinek antibiotika vyjadřují v t. zv. zřeďovacích jednotkách, které vyjadřují maximální ředění, při němž ještě nastává inhibice testovaného mikroba.

Nevýhodou výše uvedených kvantitativních čárových testů je zvláště to, že této metody nemůžeme prakticky mnohdy použít již v prvých etapách výzkumu neznámého antibiotika, kdy ještě nemáme účinnější koncentráty a kdy titr kultivační tekutiny je poměrně nízký. U těchto testů je totiž nejvyšší koncentrace antibiotika v agarových plotnách desetkrát slabší než u použitého vzorku, protože u nejvyšších koncentrací dáváme do 10 ml roztaveného agaru 1 ml vzorku antibiotika.

Abychom mohli použít pro stanovení účinku slabších koncentrátů antibiotik a abychom nemuseli provádět druhé testování pro stanovení mezihodnot, vypracovali jsme pro stanovení účinku nových antibiotik modifikovanou metodu difusních titrací na velkých mísách.

Materiál a metody

Příprava živných půd. Složení základní půdy je stejné jako u titrací streptomycinu nebo chlortetracyklinu difusní metodou (Ševčík 1954), případně mohou být podmínky upraveny na základě předběžně zjištěných vlastností nového antibiotika. U bakterií, které rostou jen na krevních agarech, používáme krevních agarů. Jako základního testovacího mikroba používáme zpravidla *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Příprava inokula. Inokulum připravujeme tak, že níže uvedené mikroby očkujeme kličkou do 3 ml bujonu a k testování bereme tyto bujonové kultury po šestihodinové kultivaci při 37 °C. Při přípravě inokula není zapotřebí u jednotlivých testovaných bakterií upravovat množství buněk na určitou hodnotu. Prakticky stejné výsledky jsme získali u suspensí mikrobů, připravených výše uvedeným způsobem a ředěných bujonem 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 a u kultur neředěných.

Příprava vzorků antibiotika. K testování bereme zpravidla kultivační tekutinu s antibiotikem, případně i čistší roztoky antibiotika. Vzorek antibiotika ředíme na koncentraci přibližně 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 a 256 j./ml. Vzorek zkoumaného antibiotika před použitím ztitrujeme na mikroba *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a účinek vyjádříme v jednotkách streptomycinu, případně v jednotkách jiného vhodnějšího standardního antibiotika.

Pracovní postup. Protimikrobní účinek antibiotika zjišťujeme na kovových nebo skleněných mísách rozměru 35 × 35 cm (Ševčík 1954, Hess 1955).

Na titrační mísu rozlejeme základní agarovou půdu, kterou rozdělíme v jedné třetině hliníkovou vložkou na dvě části. V menší části plotny rozlejeme na základní půdu 35 ml povrchového agaru se zaočkovanou suspensí spor testovacího mikroba *Bacillus subtilis* a v této části plotny provedeme běžným způsobem mikrobiologické titrace sledovaného antibiotika pro zhotovení titrační křivky. Šest různých koncentrací antibiotika, odpovídajících asi 1, 2, 4, 8, 16 a 32 j./ml, kapeme postupně po 0,1 ml pětkrát do výřezů v agaru.

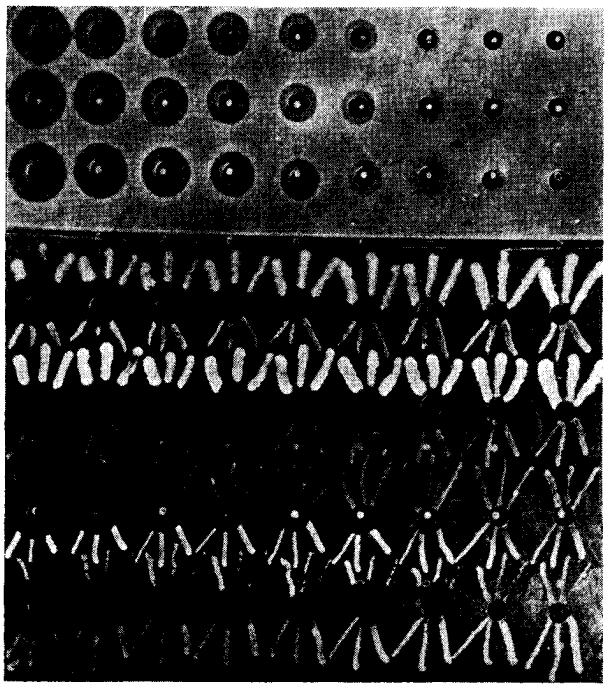
V další části mísy zhotovíme korkovrtem čtyři řady po 10 výřezech v agaru podobným způsobem jako v menší části mísy. Jednotlivé řady výřezů jsou však od sebe poněkud vzdálenější. K jednotlivým výřezům v agaru přiočkujeme po třech čarách jednotlivé testovací mikroby vždy se dvou stran. Mikroby

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

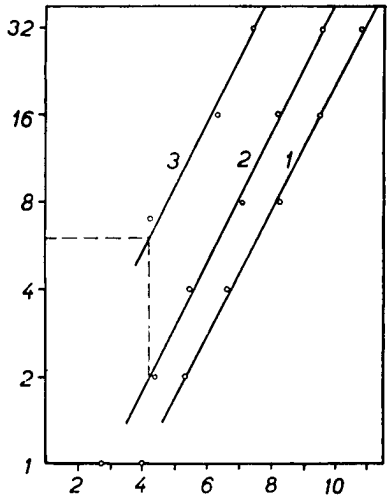
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

očkujeme vždy k jedné straně řady 10 výřezů v agaru. První čáru očkujeme k výřezu v agaru kličkou, namočenou v inokulu, a další dvě čáry očkujeme toutéž kličkou bez vypalování a namáčení (obr. 1).

Agarové plotny po naočkování níže uvedenými mikroby inkubujeme 18—24 hod. při 37 °C. U jednotlivých ředění antibiotika odečítáme inhibiční zony testovaných mikrobů, na semilogaritmický papír nanášíme průměrnou hodnotu inhibiční zony (ze tří čar) proti příslušnému ředění antibiotika a z nanesených hodnot sestrojíme pro jednotlivé testované mikroby titrační křivky.



Obr. 1. Stanovení antibakterijního účinku na agarových plotnách.



Obr. 2. Stanovení antibakterijního účinku na agarových plotnách. Křivka 1 — *Bac. subtilis*, difusní titrace, 2 — *Bac. subtilis*, čárový test, 3 — *Flavobact. fulvum*, čárový test. Osa x: velikost inhibičních zon v mm; osa y: koncentrace aktinomycinu v γ/ml.

Hodnocení výsledků. Při vyhodnocování účinku antibiotika na jednotlivé mikroby postupujeme takto: u jednotlivých testovaných mikrobů včetně mikroba *Bacillus subtilis* sestrojíme příslušné titrační křivky, z nichž vyznačíme zřetelně přímé střední úseky. Přitom dbáme, aby tyto přímé úseky byly rovnoběžné s titrační křivkou, získanou při difusních titracích v menší části agarové plotny.

Z titrační křivky (přímého úseku) standardního mikroba *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (u čárových testů) spustíme svislou přímku na křivku (přímý úsek) dalšího testovaného mikroba (obr. 2). Tím dostaneme dva body (jeden na standardní křivce mikroba *Bac. subtilis* a druhý na titrační křivce dalšího testovaného mikroba), které odpovídají stejné inhibiční zoně (aritmetická stupnice na úsečce). Na pořadnici (logaritmická stupnice) potom odečteme příslušné hodnoty koncentrací antibiotika, odpovídající získaným bodům na křivkách. Poměr mezi těmito koncentracemi antibiotika (inhibice dalšího testovaného mikroba/inhibice standardního mikroba *Bac. subtilis*) nám udává, kolikrát je testovaný mikrob citlivější nebo méně citlivý než standardní mikrob *Bac. subtilis* ATCC 6633. Tento poměr, který označujeme jako „koeficient citlivosti", vypočteme, když koncentraci antibiotika, odpovídající druhému testovanému mikrobu, dělíme příslušnou koncentrací antibiotika, odpovídající téže inhibiční zoně u standardního mikroba.

Bereme-li za základ u standardního mikroba inhibiční zonu, odpovídající 1,0 j./ml., potom můžeme u jednotlivých testovaných mikrobů odečíst příslušné koeficienty citlivosti přímo na logaritmické stupnici pořadnice.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Tak na příklad na grafu odpovídá inhibiční zoně 4,2 mm u standardního mikroba *Bacillus subtilis* ATCC 6633 koncentrace aktinomycinu 105/5 2 γ/ml a u testovaného mikroba *Flavobact. fulvum* koncentrace antibiotika 6 γ/ml. Koeficient citlivosti pro mikroba *Flavobact. fulvum* je potom 6 γ/2 γ, t. j. 3, což znamená, že použitý mikrob *Flavobact. fulvum* je 3krát méně citlivý než standardní mikrob *Bacillus subtilis* nebo že k inhibici *Flavobact. fulvum* je v našem případě zapotřebí 3krát větší koncentrace aktinomycinu 105/5 než k inhibici mikroba *Bac. subtilis* ATCC 6633.

Výsledky a diskuse

Uvedené metody používáme při testování antimikrobního účinku, a to jak u čistých preparátů, tak u filtrátů kultur aktinomycet (antibiotik v kultivační tekutině). Jako modelových antibiotik jsme v této práci použili krystalických preparátů aktinomycinů čís. 105/5 a 154. Antimikrobní spektrum použitých preparátů je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1. Antimikrobní spektrum účinku aktinomycinů čís. 105/5 a 154

Mikroorganismus	Čís. kmene SZÚ	Koeficient citlivosti	
		Antib. 105/5	Antib. 154
Bacillus subtilis ATCC 6633		1,0	1,0
Bac. megatherium	Bm 1/32	0,9	0,8
Bac. cereus	Bc 4/43	4,8	4,5
Micrococcus pyogenes aureus	Mau 1/45	1,2	1,4
Micrococcus lysodeicticus	16 t	> 32	> 32
Micrococcus cremori viscosi	37 t	> 32	> 32
Sarcina alba	48 t	1,8	1,6
Flavobact. fulvum	110 t	3,0	3,4
Flavobact. lacunatum	111 t	> 32	> 32
Escherichia coli	Mc 1/49	> 32	> 32
Escherichia freundii	EF III/6	> 32	> 32
Alcaligenes faecalis	Al 1/48	5,3	5,6
Klebsiella pneumoniae	Klp 7/48	> 32	> 32
Salmonella typhosa	typ A	> 32	> 32
S. typhi murium	SK 9/39	> 32	> 32
S. paratyphi B	PB 8/41	> 32	> 32
Shigella dysenteriae	Sh 42/52	0,9	0,9
Sh. alcalescens	Sh 4/49	> 32	> 32
Sh. ambigua	Sh 9/44	> 32	> 32
Nocardia asteroides	3/49	0,8	0,8

Jak je vidět z tabulky, je citlivost použitých mikrobů k antibiotikům vyjádřena hodnotami, které bychom získali pomocí dosud používaných metod až při druhém stanovení mezihodnot. Při prvém testování pomocí dosud běžně používaných metod dostáváme totiž pro citlivost mikrobů k antibiotikům hodnoty 1 : 2, 4, 8, 16, 32 atd.

Uvedenou metodou testování můžeme zjišťovat antimikrobní spektrum účinku též u slabších koncentrátů antibiotik. Při testování antimikrobního účinku kvantitativními čárovými testy popsanými v literatuře musíme používat účinnějších vzorků antibiotik, protože koncentrace antibiotika v agarových plotnách je desetkrát slabší než u použitého vzorku.

Další velkou výhodou uvedené metody jsou časové úspory proti postupu, kdy pracujeme obvyklým způsobem, na př. podle Waksmana a Reillyho (1945).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Souhrn

Pro stanovení účinku antibiotik byla vypracována modifikovaná metoda difusních titrací na velkých mísách. Uvedenou metodou se získávají přesnější výsledky, protože se průměry získávají z většího množství hodnot a nemusí se provádět druhé testování pro stanovení mezihodnot účinných koncentrací antibiotika; k testování můžeme použít desetkrát nižší koncentrace antibiotika než při stanovení spektra kvantitativními čárovými testy podle Waksmana a Reillyho (1945).

Účinnost antibiotika na různé mikroby se vyjadřuje t. zv. „koeficientem citlivosti", který udává, kolikrát je testovaný mikrob méně citlivý než standardní mikrob *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

V tabulce je uvedeno protimikrobní spektrum účinku krystalických preparátů aktinomycinů čís. 105/5 a 154.

Literatura

Hess, J.: *Stanovení účinnosti streptomycinu a dihydrostreptomycinu difusní metodou na kovových plotnách.* Preslia, *27* : 49, 1955.

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

Waksman, S. A., Reilly, H. CH.: *Agar-streak method.* Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed., *17* : 556, 1945.

Определение противомикробного действия антибиотиков на пластинках агара

В. Шевчик и М. Киселова

Резюме

Для определения действия антибиотиков было разработано видоизменение метода диффузной титрации на больших чашках. Предлагаемый метод дает более точные результаты: средние данные получаются на основании большего количества измерений, не приходится производить вторичные пробы для определения промежуточных величин эффективных концентраций антибиотика и для титрации можно пользоваться антибиотиком в концентрации, в 10 раз меньшей, чем при определении его спектра с помощью количественного метода штрихов по Waksman-у и Reilly (1945). Действие антибиотика на различных микробов выражается т. н. «коэффициентом чувствительности», который указывает, во сколько раз исследуемый микроб менее чувствителен, чем стандартный микроб Bacillus subtilis ATCC 6633. В таблице приводится спектр противомикробного действия кристаллических препаратов актиномицинов № 105/5 и 154.

The Determination of the Antibacterial Action of Antibiotics on Agar Plates

V. Ševčík and M. Kyselová

Summary

A modified method of diffusion titration in large dishes was elaborated for determining the action of antibiotics. This method gives more accurate results (the averages are obtained from a large number of values), there is no necessity for making a second test to determine the intermediate values of the effective concentrations of the antibiotic and a ten times weaker concentration of the antibiotic can be used for testing than for determining the spectrum by the quantitative line tests of Waksman and Reilly (1945). The effectiveness of the antibiotic against various micro-organisms is expressed by a „coefficient of sensitivity", which indicates how many times less sensitive the test microorganism is than the standard Bacillus subtilis ATCC 6633. The table shows the antibacterial spectrum of the action of crystalline preparations of actinomycins Nos. 105/5 and 154.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Krátká původní sdělení

K otázce změny serového globulinu v protilátku pod vlivem antigenu

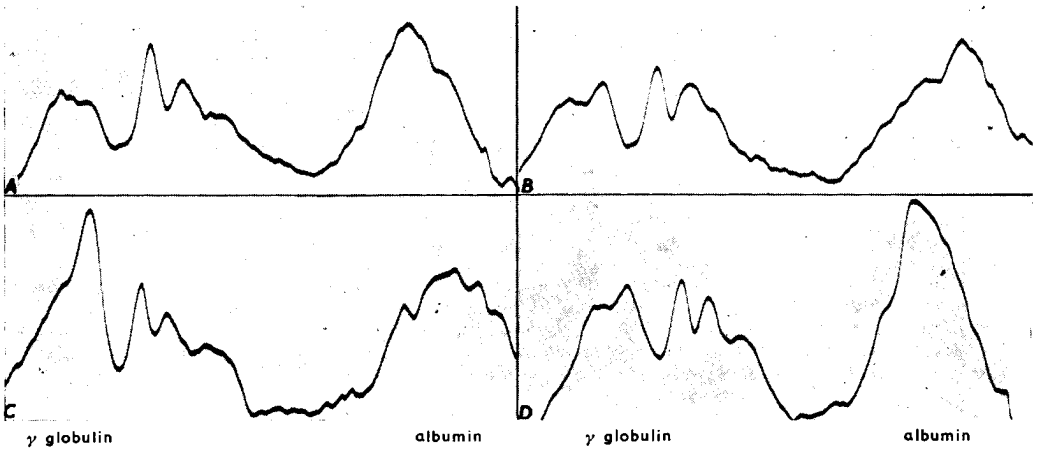
JAROSLAV ŠTERZL a ZDENĚK TRNKA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

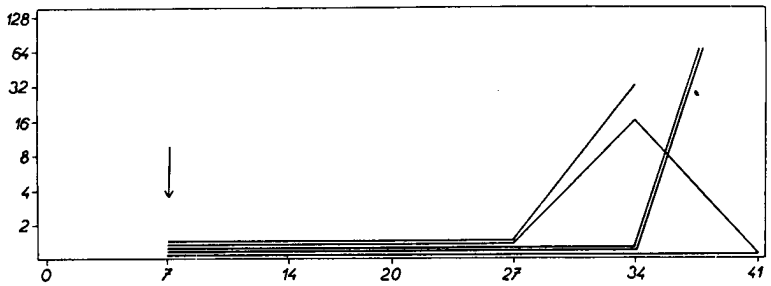
Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 14. 9. 1956

Ačkoli mnoha pokusy s aminokyselinami označenými isotopy bylo zjištěno, že tvorba protilátek je vytváření bílkovinné molekuly de novo (Gros, Coursaget a Macheboeuf 1954, Green a Anker 1954), je stále v některých úvahách uváděna možnost přeměny již hotové molekuly globulinu v molekulu protilátkového charakteru vlivem antigenu (Pressman 1953, Haurowitz 1954). Tyto závěry vycházejí především z pokusů Paulingových (1940, 1942) o tvorbě protilátek in vitro. Avšak ani tyto pokusy in vitro nebylo možno reprodukovat (Kuzin a Nevreava 1947, Hrubešová 1957).



Obr. 1. Elektroforesa ser králičích mláďat odebraných těsně po narození; A, B, C, D různá mláďata stejného vrhu.



Obr. 2. Tvorba protilátek u králičích mláďat po intraperitoneální injekci antigenu *S. paratyphi* B (10^8 mikrobů v ml).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Ve svých pokusech jsme zjistili, že nejen in vitro, ale ani v organismu není možná přeměna normálního globulinu vlivem antigenu v protilátku. U právě narozených králíčat, která ještě nessála, jsme elektroforeticky zjišťovali bílkovinné složení sera. U všech ser, odebraných jak ihned po narození, tak i další dny života mláďat, jsme stanovili všechny bílkovinné frakce v seru (obr. 1). Toto zjištění souhlasí s nálezy Brambellovými (1951, 1954), že u králíků přecházejí serové bílkoviny z matky do mláďat již v době uterinního života. Injekce antigenu mláďatům v období, kdy je v jejich krvi dostatečné množství γ-globulinu, nevyvolává u nich tvorbu protilátek (obr. 2).

Injikováním antigenu do králičích mláďat, v jejichž seru je přítomný normální γ-globulin, prokazujeme, že ani in vivo se nemění hotové globuliny vlivem antigenu v bílkovinné molekuly protilátkového charakteru.

Literatura

Brambell, W. F. R., Hemmings, W. A., Henderson, M.: *Antibodies and embryos.* Londýn 1951.

Brambell, R. F. W., Brierley, J., Halliday, R., Hemmings, W. A.: *Transference of passive immunity from mother to young.* Lancet 266 : 964, 1954.

Green, H., Anker, H. S.: *On the synthesis of antibody protein.* Biochim. Biophys. Acta 13 : 365, 1954.

Gros, P., Coursaget, J., Macheboeuf, M.: *Recherches sur l'existence de precurseur proteiques dans la formation des anticorps.* Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 1070, 1954.

Haurowitz, F.: *Proteins as antigens and antibodies. Serological approaches to studies of protein structure.* New Jersey 1954.

Hrubešová, M.: *Příspěvek k pokusům o tvorbu protilátek in vitro.* Čs. mikrobiol. 2 : 10, 1957.

Kuzin, A. M., Nevreava, N. A.: *K voprosu obrazovanija antitel in vitro.* Biochimija 12 : 49, 1947.

Pauling, L.: *A theory of the structure and process of formation of antibodies.* J. Am. Chem. Soc. 62 : 2643, 1940.

Pauling, L., Campbell, D. A.: *The manifacture of antibodies in vitro.* J. Exp. Med. 76 : 211, 1942.

Pressman, D.: *Antibodies as specific reagents.* Adv. Biol. Med. Physics 3 : 100, 1953.

К вопросу изменения сывороточного глобулина под влиянием антигена в антител

Я. Штерцль и З. Трнка

Резюме

С помощью электрофореза в сыворотке крольчат немедленно после их рождения было доказано присутствие всех белковых фракций, включая γ-глобулин. У новорожденных крольчат по крайней мере до 20-го дня жизни впрыскивания антигена S. paratyphi B не вызывает образования антител. Эти факты доказывают, что изменение уже готового сывороточного γ-глобулина под влиянием антигена в антитело невозможно и in vivo.

The Question of the Conversion of Serum Globulin into an Antibody through the Action of an Antigen

J. Šterzl and Z. Trnka

Summary

All the protein fractions, including gamma globulin, were demonstrated electrophoretically in the serum of young rabbits immediately after birth. Up to at least 20 days after birth, injection of the antigen S. paratyphi B did not elicit the formation of antibodies in young rabbits. These facts demonstrate that a change in fully formed serum gamma globulin as a result of the action of an antigen is not possible even in vivo.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

První evropské symposium o biochemii antibiotik v Miláně

Ve dnech 10.—13. září 1956 se konalo v Miláně první evropské symposium o biochemii antibiotik, pořádané časopisem Giornale di Microbiologia. Toto symposium bylo význačnou vědeckou událostí, neboť se ho zúčastnili přední odborníci v oboru antibiotik z dvanácti států.

Tematika symposia zahrnovala výzkum nových antibiotik, mechanism biosyntesy antibiotik a posléze způsob jejich účinku. V prvé sekci bylo po všeobecném úvodním referátu S. A. Waksmana (Úloha antibiotik v přírodním dění) předneseno několik taxonomických prací. E. Baldacci uvedl novou klasifikaci aktinomycet, jež je založena převažně na morfologických znacích, při čemž užívá antagonistických vlastností a určení antibiotika pro rozlišení druhů-morfologicky podobných. Y. Okami pojednal o klasifikaci skupiny *S. lavendulae* na základě chemických a imunologických kriterií. L. Ettlinger se zabýval klasifikací streptomycet produkujících aktinomycin.

P. De Somer referoval o směrech ve výzkumu nových antibiotik. Zdůraznil nutnost co nejširšího podrobného zkoumání každé nové látky, neboť antibiotika slabě účinná in vitro mohou ukázat nečekané účinky in vivo, jak ukazuje případ oxamycinu. Z nových antibiotik proti stafylokokům pokládá za nejslibnější streptogramin.

G. F. Gauze pojednal o vyhledávání protivirových antibiotik. Autor doporučuje zkoušet filtráty kultur na virus tabákové mosaiky, pak kontaktní metodou na kuřecích embryích. Pozoroval též, že je souvislost mezi antibakterijní a antivirovou účinností. Z mycelia různých druhů rodu *Penicillium* získal autor látky, působící proti virovým původcům chorob centrálního nervového systému. Přednáška i diskuse ukázaly, jak je nesnadné zvolit spolehlivou testovací metodu. Metodické obtíže jsou mnohem větší než na př. v oboru biosyntetických cytostatik.

Několik prací bylo věnováno novým nebo málo popsaným antibiotikům. E. P. Abraham uvedl další výsledky své práce na cefalosporinech. Cefalosporin C není na rozdíl od cefalosporinu N rozkládán penicilinasou, ale je jejím kompetitivním inhibitorem. Tím zvyšuje účinek penicilinu G na resistentní mikroby produkující penicilinasu. Překážkou širšího praktického užití je zatím nízká produktivita nynějších kmenů a nesnáze při isolaci.

Sklerotiorin je jedno z nejslibnějších antibiotik pro ochranu rostlin před mikrobními škůdci, neboť nepoškozuje rostliny a působí systemicky. Jeho dusíkaté deriváty, jejichž konstitucí se zabýval J. H. Birkinshaw, mají velmi zajímavé antimikrobní spektrum, odlišné od spektra matečné látky. M. Welsch frakcionoval antibiotikum aktinomycetin a zjistil, že je to směs velmi specifických peptidas, rozpouštějících povrch bakterijních buněk. R. Donovick popsal nové fungistatikum amfotericin ze skupiny konjugovaných heptaenů. Tato látka je orálně daleko účinnější než mykostatin u myší infikovaných *Candida albicans*. F. Arcamone objevil trehalosamin, nové antibiotikum účinné in vitro proti některým bakteriím i proti *M. tuberculosis*. In vivo je však účinnost velmi slabá.

Dva referáty byly věnovány antibiotokům z vyšších rostlin. A. I. Virtanen isoloval látky působící přirozenou imunitu obilných klíčních rostlin proti *Fusarium nivale*. Jsou to 2(3)-benzoxazolinon a některé jeho deriváty. Objev může mít značný praktický význam, neboť látky lze snadno připravit synteticky. L. Massart zjistil v extraktech semen cukrovky kyseliny vanilovou, ferulovou a jiné aromatické hydrokyseliny, jež působí antibakterijně a silně inhibují klíčení semen.

V druhé sekci o biosyntese antibiotik byly předneseny dva významné referáty o biosyntese penicilinu. H. R. V. Arnstein doplnil své dřívější práce o biosyntese penicilinu dalšími pokusy s prekursorováním penicilinu značenými aminokyselinami. Znovu potvrdil původní Hockenhullovu hypotesu, že penicilin vzniká kondensací L-cysteinu a valinu vytvořením peptidické a thioeterové vazby. Původ uhlíkatého řetězce kyseliny isovalerové je tedy hlavním dílčím problémem při biosytese penicilinu. Podle D. J. D. Hockenhulla tvoří se tato kyselina buď kondensací acetoctanu a aktivního acetátu na hydroxymethylglutarát a jeho dekarboxylací, nebo kondensací pyruvátu a acetaldehydu na acetolaktát, z něhož se dospěje přesmykem k hydroxyketoisovalerátu. Za dobrých podmínek fermentace je cyklus trikarboxylových kyselin blokován konversí α-ketoglutarátu na glutamát, takže je k disposici přebytek kyseliny pyrohroznové a acetoctové pro biosyntesu penicilinu.

Podobnou metodikou, hlavně použitím značených prekursorů, řešil G. D. Hunter problém biosytesy streptomycinu. A. Di Marco uvedl několik poznatků o biosyntese chlortetracyklinu, jimiž doplnil dřívější publikace svých spolupracovníků o tomto problému.

Do této sekce byl též zařazen referát E. Bělíka, M. Herolda a J. Doskočila (přednesl M. Herold), týkající se biosyntesy chlortetracyklinu bez dodržení podmínek asepse. V diskusi bylo konstantováno, že tento způsob fermentace je zcela původní, prakticky důležitý i teoreticky významný.

Třetí část kongresu, jejímž předmětem byl mechanism účinku antibiotik, byla zahájena souborným referátorem H. Floreye o vývoji resistence mikroorganismů vůči antibiotikům. Problém resistentních

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

stafylokoků není dosud známými látkami uspokojivě vyřešen. Poměrně nejlepší výsledky dává zatím novobiocin, ale i vůči této látce vyvíjejí stafylokoky rychle resistenci. U střevních nákaz lze bez nebezpečí užít kombinace bacitracinu s neomycinem. B. A. Newton přednesl referát o způsobu účinku polypeptidových antibiotik, zvláště polymyxinu. W. W. Umbreit stále považuje inhibici kondensace oxalacetátu a pyruvátu za podstatu antimikrobní účinnosti streptomycinu, ač byly nedávno vzneseny pochybnosti o všeobecné platnosti tohoto tvrzení. Další referáty v této sekci, týkající se mechanismu účinku penicilinu, morfologických změn vlivem antibiotik a příčin autoinhibice bakterií, nepřinesly zásadní nové poznatky, ač teoreticky byly zajímavé. B. W. Carey referoval o podrobných studiích krátkodobé konservace masa namáčením ve zředěných roztocích antibiotik.

Ve svém celku poskytlo symposium dobrý přehled o dnešním stavu a výhledu do budoucna v oboru biochemie antibiotik. Problém resistentních stafylokoků, chronických infekčních onemocnění a nemocí působených patogenními houbami podaří se patrně některými z nových preparátů úspěšně vyřešit. V oboru protivirových látek nebylo dosud dosaženo úspěchu hlavně snad proto, že bylo nutno překonat metodické překážky nepoměrně větší než u antibakterijních látek. Ani na poli cytostatik nebyl dosud získán dostatečně účinný preparát.

Nedílnou součástí mikrobiologické práce v oboru antibiotik je šlechtění kmenů produkujících nové látky i základní technicky vyráběná antibiotika, jejichž výtěžnost je touto cestou stále velmi účinně stupňována.

Doc. Ing. M. Herold a Dr J. Doskočil

Mezinárodní konference o přírodně ohniskových encefalitidách

Ve dnech 9.—11. října 1956 pořádala Československá akademie věd a Ministerstvo zdravotnictví ve Smolenicích na Slovensku mezinárodní poradu o přírodně ohniskových encefalitidách. Účastnili se jí kromě našich virologů, epidemiologů, parasitologů a kliniků též hosté z Dánska, Finska, Jugoslavie, Maďarska, Polska a SSSR. Úkolem konference bylo zhodnotit dosavadní výsledky, získané v boji proti přírodně ohniskovým encefalitidám, zejména klíšťové encefalitidě a pomoci jejich dalšímu výzkumu. Porada projednala sedm hlavních temat. Úvodem ke každému tematu přednesli referáty obvykle jeden domácí a jeden zahraniční účastník. Ke každému tematu se samostatně diskutovalo.

Úvodní referát k prvnímu tematu „Komplexní výzkum přírodně ohniskové encefalitidy" přednesl akademik D. Blaškovič. Uvedl v něm výsledky a zkušenosti získané při práci s klíšťovou encefalitidou i jinými přírodně ohniskovými infekcemi a zdůraznil nutnost výzkumu těchto nákaz za nejtěsnější spolupráce virologů, mikrobiologů, epidemiologů, parasitologů, zoologů, humánních i veterinárních lékařů. Diskuse potvrdila správnost vývodů úvodního referátu a poukázala na potřebu zpřesnění některých terminologických pojmů. Byl schválen návrh na vytvoření mezinárodní terminologické komise. Výsledky jednání této komise budou zveřejněny v časopisech Voprosy virusologiji a Acta virologica. Dále byl vysloven souhlas s návrhem, aby se realisovala těsná mezinárodní spolupráce při výzkumu přírodních ohnisek nákaz, a to výměnou odborníků, organisací společných expedicí, výměnou virových kmenů, diagnostických jakož i profylaktických a léčebných prostředků. Konference doporučila, aby se příští mezinárodní porada o přírodně ohniskových encefalitidách konala v roce 1958 v Moskvě.

Úvodní referáty k druhému tematu „Konfrontace epidemiologických zkušeností v jednotlivých zemích" přednesli prof. K. Raška (ČSR) a prof. F. Przesmycki (Polsko), kteří podali epidemiologický rozbor klíšťové encefalitidy ve svých zemích. V. I. Iljenko (SSSR) referovala o mechanismu alimentární infekce u dvojvlnové virové meningoencefalitidy. V diskusi se konstatovalo, že v různých evropských zemích se vyskytují encefalitidy stejného epidemiologického charakteru. Většina diskutujících se shodla v názorech, že není dostatek faktického materiálu, aby se mohlo hovořit o dvojvlnové meningoencefalitidě jako samostatné nosologické jednotce. Potvrdila se dále možnost přenosu nákazy kozím mlékem. Zajímavá byla sdělení poukazující na komáry jako možné přenašeče. Bylo doporučeno věnovat těmto otázkám zvýšenou pozornost.

Třetí tema „Parasitologický výzkum jako součást výzkumných prací přírodně ohniskových encefalitid ve střední Evropě" zahájil úvodním referátem Dr B. Rosický, který hovořil o podmínkách existence přírodních ohnisek nákaz ve střední Evropě, podal jejich klasifikaci a načrtl program dalších zoologických výzkumů ohnisek klíšťové encefalitidy. Ve střední Evropě se zachovaly biocenosy, v nichž virus klíšťové encefalitidy přežívá a které neuvědomělým zásahem lidí byly obohaceny o další reservoirová zvířata a klíšťata. Dosavadní zkušenosti ukazují, že samotné agrotechnické zásahy k úplné likvidaci přírodně ohniskové encefalitidy nedostačují. Doporučuje se vyzkoušet možnosti boje proti klíštěti insekticidními látkami.

Ke čtvrtému tematu „Biologie virusů středoevropské klíšťové encefalitidy" hovořila v úvodě Dr H. Libíková o výsledcích výzkumu virů klíšťové encefalitidy v ČSR a doc. J. Vesenjaková (Jugoslavie) o biologii slovinských a rakouských kmenů. Diskuse byla velmi bohatá a konstatovalo se v ní, že se dosud podařilo isolovat virus z lidí, z klíšťat a divokých drobných hlodavců. Jako vhodná kulti-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

vační prostředí se ukázala kuřecí embrya a rozličné tkáňové kultury. Významné byly diskusní příspěvky o persistenci viru v mléce a o možnostech desinfekce, zejména ve spojitosti s vylučováním viru klíšťové encefalitidy do mléka zvířat. V tomto úseku je nutno prohloubit studia morfologická, biochemická a biofysikální, i když tato již poskytla nejdůležitější údaje o vlastnostech viru KE.

Páté tema pojednávalo o virologicko-diagnostických metodách u klíšťové encefalitidy. V úvodě hovořil Dr V. Bárdoš (ČSR) a Dr F. Fornosi (Maďarsko). Byl vytyčen požadavek dalšího zpřesnění a zjemnění isolačních i serologických metod u klíšťové encefalitidy i jiných neurotropních onemocnění. Sjednocení těchto snah má provést Centrum pro výzkum encefalitid v Moskvě, kterému konference doporučila zřídit komisi pro diagnostické metody.

Jako úvod k šestému tematu „Možnosti specifické terapie a prevence klíšťové encefalitidy" byl přečten referát nepřítomného Dr D. Slonima „Problémy ochranného očkování u klíšťové encefalitidy". Informace o vakcinaci u tohoto onemocnění podali přítomní sovětští delegáti. Konference pokládá za nutné zdokonalovat dosud v praxi používané přípravky. Bylo navrženo, aby tam, kde není k disposici vlastní vakcina, byla vyžádána z SSSR. Dále bylo doporučeno další studium využití γ-globulinu k terapeutickému použití u klíšťové encefalitidy.

Sedmé tema „Konfrontace klinických zkušeností a terapeutických metod" zahájily tři úvodní referáty: Dr F. Hanzala a akademika K. Hennera (ČSR), Dr G. Grinschgla (Rakousko) a E. F. Davidenkové (SSSR). Z diskuse vyplynulo, že z klinických důvodů je nutno rozlišovat různé formy klíšťové encefalitidy, i když nebyly dosud zjištěny odchylky v antigenní struktuře jednotlivých virových kmenů. Byla zdůrazněna nutnost vypracovat virologickou metodu k rychlé diagnose a pokud tato není k disposici opírat se o důkladné, zejména neurologické vyšetření. K označení nemoci doporučeno používat název „klíšťová encefalitida s různými klinickými formami". Doporučuje se spojení s terminologickou komisí WHO.

Závěrem možno konstatovat, že konference splnila své poslání, ukázala stav výzkumu klíšťových encefalitid v jednotlivých zemích, vytyčila nejdůležitější úkoly pro další výzkum a utužila mezinárodní vědeckou spolupráci.

D. Málková

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Směrnice pro přípravu článku

Čs. mikrobiologie uveřejňuje původní vědecké práce z různých oborů mikrobiologie (mikrobiologie obecné, lékařské, zemědělské a půdní), které přispívají k řešení obecných otázek. Otiskují se původní vědecké práce, krátká původní sdělení, přehledné referáty, diskusní články, recense knih, zprávy a redakční články. Předběžná sdělení budou uveřejňována jen výjimečně u prací zásadního významu.

Obecné pokyny

Autor má plnou odpovědnost za původnost práce, za její věcnou i formální správnost. Jako původní sdělení lze publikovat pouze takové výsledky, jejichž podstata nebyla dosud uveřejněna nebo podána autorem k uveřejnění jinde, ať doma či v zahraničí. Výjimku tvoří případná předběžná sdělení, na něž musí být v práci odkázáno. Podstatný obsah práce publikované Čs. mikrobiologii nelze uveřejnit jinou formou bez svolení redakce. Závažné práce se uveřejňují v některém ze světových jazyků ve Folia biologica, které jsou cizojazyčným vydáním časopisů Čs. biologie a Čs. mikrobiologie.

Práce má být sepsána až tehdy, je-li určitý uzavřený úsek výzkumu ukončen. Rozsah publikací má být volen úměrně rozsahu a významu nových poznatků. Je zbytečné popisovat předběžné a nezdařilé pokusy. O negativních výsledcích lze velmi stručně referovat jen tehdy, jsou-li samy nebo jejich důsledky theoreticky či prakticky zvlášť významné nebo zajímavé. Velkou pozornost má autor věnovat též jazykové stránce, aby rukopis byl sepsán správnou češtinou.

Název práce má být volen tak, aby výstižně vyjádřil thema a zaměření práce; práce publikované v řadě mají skupinový název s číslem sdělení a vlastní název. Vlastní text práce musí být logicky členěn na kapitoly, případně odstavce, opatřené nadpisy. Autor má uvést předpoklady, z nichž vycházel, cíle, které sledoval, způsob, jak práci konal, výsledky, jichž dosáhl, a závěry, které vyvozuje. Je nutno dbát na to, aby se tytéž nebo podobné údaje neopakovaly v jednotlivých částech práce. Členění, stavba i forma se volí podle druhu náplně a poslání práce, při čemž se přihlíží k některým obecným zásadám a zvyklostem časopisu. Práce má být členěna do těchto kapitol:

Úvod. Obsahuje úvod do problematiky, údaje literatury a všeobecné úvahy, které jsou nutné k pochopení práce a vlastní problematiky. Nejde-li o úvodní sdělení v rozsáhlejší řadě souvisících prací, nemá úvod obsahovat vyčerpávající přehled literatury.

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

Výsledky. V této kapitole se uvádějí zjištěná data, závislosti a pozorování v logickém a jasném utřídění experimentálního materiálu. Získané údaje se uvádějí v přehledně uspořádaných tabulkách nebo obrázcích (grafech). Tabulky a jejich grafické znázornění lze současně uveřejnit jen tehdy, je-li to bezpodmínečně nutné pro pochopení práce. Tabulky a obrázky (grafy) je nutno volit tak, aby zaznamenávaly nebo shrnovaly důležité kvantitativní výsledky a ilustrovaly vyslovené závěry. Fotografie nebo kresby se uvádějí tehdy, jestliže ilustrují fakta, která nemohou být popsána v textu.

Diskuse má být přísně omezena jen na diskutování a nemá sloužit k rekapitulaci výsledků. Zde je nutné podat kritický rozbor výsledků, jejich zhodnocení a interpretaci. Diskutovat jen o otázkách, souvisících s předloženými výsledky. Z diskuse má vyplynout, co práce přináší nového. V některých případech je možné spojit část diskusní s výsledky v kapitolu Výsledky a diskuse.

Souhrn. V souhrnu uvede autor konkretní formou podstatné výsledky vlastní práce. Není třeba uvádět zde obecně známé skutečnosti.

Ke každé práci předloží autor souhrn pro cizojazyčné resumé, který má být širší než souhrn ve vlastní práci a má být volen tak, aby z něho byl zřejmý cíl práce, pracovní postup a hlavní dosažené výsledky. Případné poděkování se uvádí na konci práce. Práci uzavírá seznam literatury.

Všechny práce procházejí recensním řízením. Připomínky recensentů a redakce mají za úkol především zlepšit kvalitu publikací. Redakce provádí v rukopise změny jen se souhlasem autora, vyjma menších úprav, které zjasňují nebo zestručňují práci. Nesouhlasí-li autor s návrhy recensentů a redakce, přísluší konečné rozhodnutí redakční radě časopisu.

Technické pokyny

Korespondence. Rukopisy prací je třeba zaslat s jednou kopií na adresu Biologický ústav ČSAV, redakce Čs. mikrobiologie, Na cvičišti 2, Praha 6 - Dejvice. K rukopisu přiloží autor titulní list, který obsahuje příjmení a jména autorů, název práce, adresu pracoviště a případně adresu, na niž má být autorovi zasílána korespondence. Redakce potvrdí příjem rukopisu. Rukopisy jsou majetkem redakce a nemusí být autorovi vráceny.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Úprava rukopisů. Rukopis musí být psán na stroji, s dvojitými mezerami (řádkování 2), s širokým okrajem (alespoň 3 cm) na dobrém bílém papíru formátu A4. Průsvitné nebo křídové papíry nejsou přípustné. Formální úprava rukopisů se doporučuje podle úpravy prací thematicky podobných, uveřejněných v Čs. mikrobiologii.

Tabulky. Tabulky musí být přehledné, jasně a logicky uspořádané, s minimálním počtem sloupců. V uzavřených tabulkách se zpravidla linkami oddělují pouze sloupce a záhlaví. Tabulky musí být napsány na zvláštním papíru, připojeny mimo text a jasně označeny pořadovým číslem. Každá tabulka má legendu, která musí být volena tak, aby tabulka byla srozumitelná bez studia textu. Každá legenda má výstižný nadpis. Rovněž legendy, označené pořadovým číslem tabulky, musí být napsány na zvláštním papíru, připojeným za text práce.

Obrázky. Obrázky musí být výstižné a jasné, přehledné a přesně označené, fotografie musí být dokonale ostré, kontrastní, na papíru s lesklým hladkým povrchem a má být u nich uvedeno zvětšení. Grafy je třeba kreslit černou tuší na bílém kladívkovém nebo pausovacím papíru. Velikost výkresu má být asi 3krát větší než požadovaná velikost v tisku. Jednoduché grafy se zpravidla zmenšují tak, aby bylo možno zařadit na stránku 2 grafy vedle sebe. Znaky na obrázku musí být úměrně veliké a kreslené šablonou, při čemž má být respektován i druh písma (ležaté písmo). Redakce vyžaduje uzavřené grafy s rámečkem bez sítě, s kótováním vně rámečku. Slovní popis je nutno uvést v legendě a nikoliv v obrázku samém. Popis os souřadnic musí být přesný a jednotky měřítka jasně vyznačeny. Křivky se označují čísly a vysvětlení se uvede v legendě. Grafy, které po technické stránce nevyhovují, vrátí redakce autorovi k překreslení, nebo je dá překreslit na autorův náklad. Obrázky se na zadní straně označují jménem autora, zkráceným názvem práce a pořadovým číslem. O legendě platí totéž co o legendě u tabulek.

Citace. Citace v textu píšeme: Vinogradskij (1894) nebo (Vinogradskij 1894). Jsou-li autoři dva, uvádějí se vždy oba, na př. Walker a Warren (1938). Jsou-li tři, uvádějí se po prvé všichni tři (Úlehla, Spurný a Dostálek 1956), dále jen první (Úlehla a sp. 1956). Jsou-li čtyři autoři nebo více, uvádí se v textu jen první z nich. Citují-li se od jednoho autora dvě práce z téhož roku, přidává se za rok a, b atd. (1956a, b). Citace v seznamu literatury obsahují příjmení autorů a iniciály jmen, název práce, název časopisu, ročník a stránku, rok vydání (Šilhánková, L: Selektivní inhibice drsných forem kvasinek. Čs. mikrobiol. 1 : 204, 1956). Citace se seřazují abecedně podle autorů a nečíslují se. Názvy časopisů se zkracují ve shodě s „List of Periodicals Abstracted by Chemical Abstracts". V seznamu literatury není možno uvádět údaje jako „nepublikované údaje", „osobní sdělení", „v tisku" a pod. Citace knih obsahuje: příjmení autora a iniciály jmen, název knihy, vydání, vydavatele, místo a rok vydání.

Zkratky a symboly. Doporučuje se používat jen těch zkratek, které jsou ve světové literatuře běžné. V prvním případě, kdy se zkratky použije, je nutno uvést celý název. Není vhodné zavádět neobvyklé zkratky, byť i se tím sledovalo zkrácení textu. Pro fysikálně chemické symboly a zkratky jsou závazné směrnice uveřejněné v Chemických listech 47 : 1722—1732, 1954. Názvy sloučenin mají být nahrazovány chemickými vzorci pouze tehdy, jsou-li spojeny se symbolem (na př. s údajem koncentrace: 0,01N H_2SO_4), nebo ve výčtech delší řady sloučenin, skupin či iontů.

Nomenklatura. Chemické názvosloví musí být ve shodě s běžnými zásadami autoritativní české nebo slovenské odborné literatury. V mikrobiologické nomenklatuře používáme k označení mikroorganismů latinských jmen, která při prvém výskytu uvádíme vždy nezkráceně (*Salmonella paratyphi B*). Při opakovaném výskytu je možno použít zkratky pro podstatné jméno, označující rod, avšak jen v těchto případech, kdy je vyloučena jakákoliv záměna. Je nutné vyhýbat se vulgárním označením mikroorganismů a laboratorní hantýrce.

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

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

Dodržování směrnic zkracuje dobu od přijetí k uveřejnění práce. Redakce si vyhrazuje právo vrátit autoru k přepracování rukopis, který neodpovídá podmínkám uvedeným v těchto směrnicích. Neodpovídá-li rukopis směrnicím a neřídí-li se autor uvedenými pokyny, zdrží se práce v redakci a opozdí se uveřejnění publikace.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

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 23. února 1957. - A-02089

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8

СОДЕРЖАНИЕ

Штерцль Я.: Образование антител изолированными клетками селезенки после их смешивания с антигеном in vitro 1

Грубешова М.: К вопросу опытов образования антител in vitro 10

Йогановский Ю.: Значение стафилококкового альфа токсина и лейкоцидина 15

Халоупка Ю.: Протеолитические энзимы актиномицета Streptomyces griseus. IV. Влияние ионов на образование энзима 23

Белик Э., Геролд М., Доскочил Ю.: Новые способы биосинтетического производства антибиотиков. I. Биосинтез хлортетрациклина без соблюдения асептических условий 30

Вондрачкова И.: Значение подачи кислорода для продукции антибиотиков. I. Применение сульфитного метода для ферментации на механических качалках 37

Досталек М., Штауд М., Росыпалова А.: Воздействие микроорганизмов на углеводороды нефти 43

Быстрицкий В.: К вопросу структуры вируса табачной мозаики 49

Шевчик В., Киселова М.: Определение противомикробного действия антибиотиков на пластинках агара 53

Краткие сообщения

Штерцль Я., Трнка З.: К вонросу изменения сывороточного гловулина нод влиянем антигена в антител 57

Хроника 59

CONTENTS

Šterzl J.: The Formation of Antibodies by Isolated Spleen Cells after Admixture with an Antigen in vitro 1

Hrubešová M.: Notes on Experiments on the Formation of Antibodies in vitro 10

Johanovský J.: The Significance of Staphylococcal α toxin and Leucocidin 15

Chaloupka J.: Proteolytic Enzymes of the Actinomyces Streptomyces griseus. IV. The Influence of Ions on the Formation of Enzyme 23

Bělík E., Herold M., Doskočil J.: New Methods of the Biosynthetic Production of Antibiotics. I. The Biosynthesis of Chlortetracycline without Maintaining Aseptic Conditions 30

Vondráčková J.: The Importance of the Transfer of Oxygen for the Production of Antibiotics. I. The Application of the Sulphite Method for Fermentation on Shaker Apparatuses 37

Dostálek M., Štaud M., Rosypalová A.: The Effect of Micro-organisms on Petroleum Hydrocarbons 43

Bystrický V.: On the Structure of the Tobacco Mosaic Virus 49

Ševčík V., Kyselová M.: The Investigation of the Antibacterial Action of Antibiotics on Agar Plates 53

Briefs Reports

Šterzl J., Trnka Z.: The Question of the Conversion of Serum Globulin into an Antibody through the Action of an Antigen 57

News 59

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500007-8