Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

25X1

Page Denied

Next 2 Page(s) In Document Denied

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 5.

Effect of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase

M. BURGER, J. ROKOS and P. PROCHÁZKA
Institute of Biology of the Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received June 27, 1956

On fermentation of chlortetracycline by Actinomyces aureofaciens the fermentation medium usually contains a source of starch (Van Dyck, De Sommer 1952) which splits up into lower derivatives. The extent of starch hydrolysis and the possibility of using the sugars produced depend on the activity of amylolytic enzymes.

It might be expected that with the accumulation of chlortetracycline in the fermentation medium, particularly at higher concentrations of this antibiotic, the activity of enzymes hydrolysing starch would be altered (Arora and Krishna Murti 1952). Even though starchy raw materials (soya bean meal etc.), contained in the fermentation medium, probably have more functions than being the mere source of carbon, the process must be conducted, for economic reasons, so as to make the best use of the starch itself.

In order to study the effect of chlortetracycline on amylolytic enzymes, an enzyme preparation was used from the mould Aspergillus oryzae: this is known, under the experimental conditions in question, to hydrolyse starch exclusively by the action of α-amylase (Burger and Beran 1956). Higher concentrations of chlortetracycline were observed to have a strong inhibitory effect on this enzyme during the dextrination of starch.

The purpose of the present work was to study the conditions under which inhibition occurs and to try to find a method of preventing it, and, on the basis of the information so obtained, to study the activity of amylase during the fermentation of chlortetracycline by the strain of Actinomyces aureofaciens used commercially.

Material and Methods

Analytical methods. The activity of α-amylase was determined using the author's modification of the Wohlgemuth method (Belozersky and Proskuryakof 1951). Visual comparison of the starch iodine complex with the standard solution was replaced by determination on a Pulfrich colorimeter. The red filter S 66, through which the iodine starch complex showed the highest absorption, proved to be the best from among the set of standard filters available. The time taken for the dextrination of starch, required for the calculation of the Wohlgemuth amylolytic units, was determined by the extrapolation of the final transmission values. The activity of α-amylase is expressed both in units (Belozersky and Prokuryakof 1951) and in percentage transmission in relation to the standard solution.

Chemicals used. Soluble starch p. a. (Lachema), chlortetracycline with 50% biological activity (Lederle Lab.) and the other chemicals analytically pure.

Method. The enzyme preparation of A. oryzae, which under the given experimental conditions (Burger and Beran 1956), causes dextrinization of starch exclusively by the action of α-amylase, was used for the experiments. A suspension of this preparation in physiological saline was filtered and the filtrate was dialysed for 24 hours at room temperature against a 400 times larger volume of redistilled water, changed three times. The amount of enzyme used was chosen so that dextrination was complete

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

in about 45 minutes. The final concentration of starch was 1%. If not stated otherwise, the reaction of the mixture was maintained at pH 5.6 by 0.1 M acetate buffer. Incubation took place at 30° C in a water bath. The concentrations of antibiotic given are in relation to the final amounts of biologically active chlortetracycline. The pH of the reaction solution was checked after each experiment by an electron pH meter with a glass electrode.

Results

The Effect of pH and Buffers on the Inhibition of Starch Dextrination

It was found that higher concentrations of chlortetracycline have an inhibiting effect on the activity of α-amylase of the mould A. oryzae. The concentration of chlortetracycline at which inhibition appears varies between 8×10^{-4} M and 1.2×10^{-3} M (fig. 1—3).

Inhibition depends on the kind of buffer used and on the pH of the solution. In an acetate buffer at pH 6.0 (fig. 2), chlortetracycline causes inhibition at concentrations higher than 1.2×10^{-3} M. In a phosphate buffer of the same pH, chlortetracycline causes inhibition at a concentration as low as 8×10^{-4} M. In a phosphate buffer at pH 7.0 and with the same concentration of antibiotic, inhibition is greater (fig. 1 and 3).

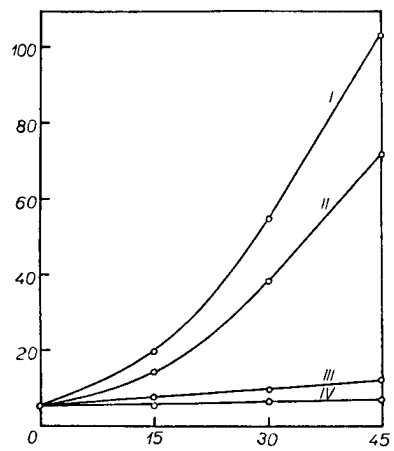


Fig. 1. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of A. oryzae α-amylase in a Phosphate Buffer of pH 6.0. x: time in mins., y: transmission in %. pH of solution 6.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 400 μg., III: 600 μg., IV: 800 μg. and 1000 μg. chlortetracycline in 1 ml.

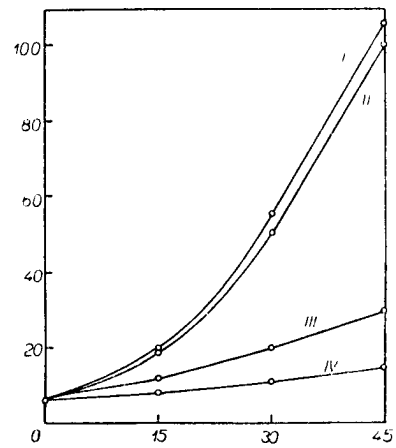


Fig. 2. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of A. oryzae α-amylase in an Acetate Buffer of pH 6.0. x: time in mins., y: transmission in %, pH of solution 6.0, buffered by acetate at final concen-tration of 0.1 M. I: control and 400 μg., II: 600 μg., III: 800 μg., IV: 1000 μg. chlortetracycline in 1 ml.

The inhibiting effect of chlortetracycline on starch dextrination is present in an acetate buffer from pH 4.8 upwards (fig. 4).

The Influence of Ca^{++} on the Inhibitory Effect of Chlortetracycline

It is well-known that Ca^{++} acts as a stabiliser for α-amylases. We have proved, however, that under our experimental conditions, the inhibition of α-amylase is not

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

caused by the removal of Ca^{++} from the solution by chlortetracycline. Even a large excess of Ca^{++} (tab. 1) did not cause any substantial changes in the inhibiting effect of chlortetracycline. The results and the fact that a dialysed enzyme solution was used in all experiments, prove that the inhibitory effect of chlortetracycline is not caused by the removal of a low molecular stabiliser.

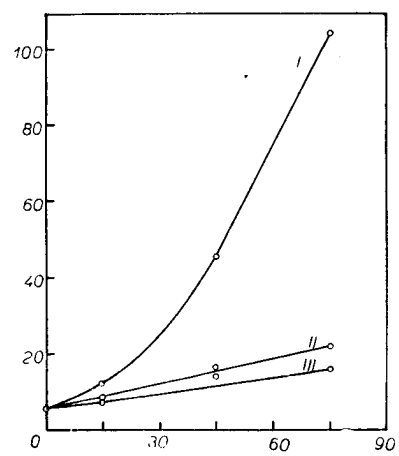


Fig. 3. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of A. oryzae α-amylase in a Phosphate Buffer of pH 7.0. x: time in mins., y: transmission in %, pH of solution 7.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 400 μg., III: 600 μg., 800 μg. and 1000 μg. chlortetracycline in 1 ml.

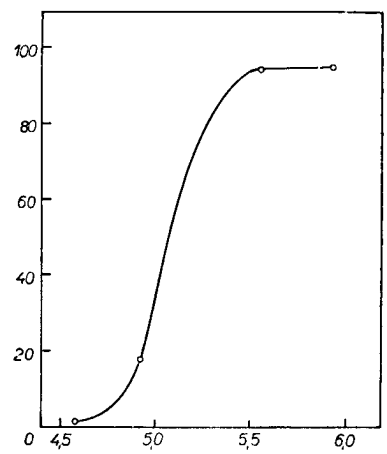


Fig. 4. Effect of pH on Inhibition of A. oryzae α-amylase by Chlortetracycline. x: pH, y: % inhibition of A. oryzae α-amylase by chlortetracycline. Buffered by acetate at final concentration of 0.1 M. Final concentration of chlortetracycline 2×10^{-3}M.

The Effect of some Organic Acids on the Inhibitory Effect of Chlortetracycline

Previous experiments had already shown (fig. 1 and 2) that the inhibition of α-amylase, caused by chlortetracycline, depends on the kind of anions present. If the anions of some organic acids, e. g. of citric or oxalic acid in concentrations of 2×10^{-2} M are present, inhibition disappears completely. The anions of phthalic, benzoic, fumaric and tartaric acids partially reduced inhibition; lactic and propionic

Table 1. Effect of Ca^{++} on Inhibition of α-amylase by Chlortetracycline buffered by acetate, pH 5.6, at final concentration 0.1 M

Experiment No.	Final Concentration		α-amylase units
	of Chlortetracycline	of $CaCl_2$	
1	1.8×10^{-3} M	1.8×10^{-2} M	0.84
2	1.8×10^{-3} M	6×10^{-3} M	0.74
3	1.8×10^{-3} M	—	0,45
4	—	1.8×10^{-2} M	3.30
5	—	6×10^{-3} M	3.50
6	—	—	3.50

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Table 2. Effect of some Organic Acids on Inhibition of α-amylase by Chlortetracycline buffered by acetate pH 5.6, final concentration 0.1 M. Final concentration of sodium salts of acids 2×10^{-2} M, of chlortetracycline 2×10^{-3} M

Sodium salt of added acid	α-amylase units			
	Addition of			
	0	Acid	Chlortetra-cycline	Chlortetra-cycline and acid
Oxalic	3.79	3.83	0.28	3.68
Citric	3.82	3.69	0.25	3.28
Phthalic	3.83	3.83	0.26	2.71
Fumaric	3.83	3.83	0.28	1.54
Benzoic	3.83	3.83	0.26	1.47
Tartaric	3.79	3.67	0.28	1.44
Propionic	3.83	3.75	0.23	0.27
Lactic	3.83	3.83	0.23	0.23

acids in acetate buffer had no effect whatsoever on inhibition caused by chlortetracycline (tab. 2). These findings provided a starting point for resolving other problems, particularly as to whether inhibition of the activity of α-amylase by chlortetracycline is reversible or irreversible.

The addition of citrate (acetate buffer) or acetate (phosphate buffer) to a reaction mixture in which α-amylase has previously been inhibited by chlortetracycline, removes the inhibition (fig. 5 and 6). The rate of starch dextrination after the addition of these acids is the same as when chlortetracycline is not present. The

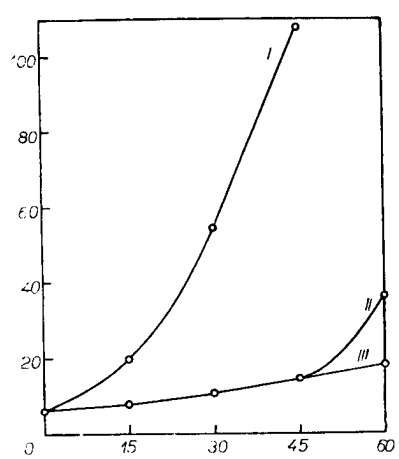


Fig. 5. Effect of Subsequent Addition of Citrate on A. oryzae α-amylase Inhibited by Chlortetracycline. x: time in mins., y: transmission in %. pH of solution 6.0, buffered by acetate at final concentration of 0.1 M. I: control, II: 1000 μg. chlortetracyeline in 1 ml. in the 45th minute. 1 ml. of Na-citrate (final concentration $2 \times \times 10^{-2}$ M), has been added. III: 1000 μg. chlortetracycline in 1 ml., in the 45th minute, 1 ml. of H_2O has been added.

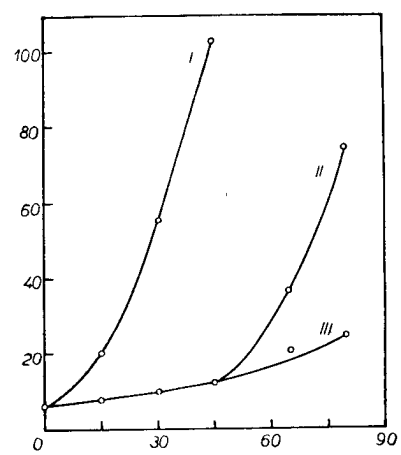


Fig. 6: Effect of Subsequent Addition of Acetate on A. oryzae α-amylase Inhibited by Chlortetracycline. x: time in mins., y : transmission in %, pH of solution 6.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 600 μg. chlortetracycline in 1 ml., in 45th min. 1 ml. Na-acetate (final concentration 2×10^{-1} M) has been added, III: 600 μg. chlortetracycline in 1 ml. in 45th min. 1 ml. of H_2O has been added.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

removal of inhibition is thus complete. The results given here prove that inhibition of α-amylase by chlortetracycline is reversible.

Discussion

In addition to studies on the bacteriostatic or bactericidal effect of antibiotics, a number of papers have been published dealing with the question of the action of antibiotics on separate enzyme systems both in vivo and in vitro (Agarwala et al. 1952, Arora et al. 1954, 1955a, b, Brody et al. 1954, Ghatak et al. 1953, Iyer et al. 1953, Jacobson et al. 1954, Loomis 1950, Saz et al. 1954, Zimmerman et al. 1953). It is a characteristic feature of these papers that far higher concentrations of antibiotics were used than those at which their bacteriostatic and bactericidal properties are already displayed. This very fact would suggest that in these cases the effect of antibiotics on the enzyme system is non-specific and it is doubtful whether the results obtained can be used to explain changes in enzymatic processes at concentrations of the antibiotic which affect the multiplication of the microorganisms. We also used high concentrations of chlortetracycline when studying its effect on the activity of α-amylase in starch dextrination. The concentrations used, however, are of importance in the fermentation of Actinomyces aureofaciens, where the high concentration of the antibiotic can affect some enzyme systems.

Our experiments prove that higher concentrations of chlortetracycline inhibit dextrination by α-amylase of A. oryzae. It is important that this inhibition can easily be removed by some organic acids, which alone, however, do not affect the activity of the enzyme in question. This provides the possibility of studying how α-amylase of Actinomyces aureofaciens is affected during fermentation with the production of chlortetracycline and, in case of inhibition, of measuring the α-amylase content.

Van Meter and Oleson (1951) assume that chlortetracycline inhibits some reactions in Kreb's cycle, since citric acid removed inhibition by chlortetracycline in studies on the respiration of rat liver homogenates. The fact that citric and other acids removed the inhibitory effect of chlortetracycline on the amylolytic enzyme system in our experiments too, suggests that chlortetracycline may affect other systems connected with liver respiration.

In some cases lower concentrations of antibiotics stimulate enzyme activity while higher concentrations inhibit it (Smith et al. 1949). This may also apply for the action of chlortetracycline on α-amylase. Arora et al. (1952) found that with lower concentrations than those used in our experiments there is activation of the amylolytic systems of malt and moulds. It must be stressed, however, that these authors observed the activity of the amylolytic system from the point of view of increasing the reduction rate, and did not exclude the effect of other enzymes, particularly maltase.

Summary

The inhibitory effect of chlortetracycline in concentartions of 8×10^{-4} M and higher on the dextrination activity of α-amylase of the mould Aspergillus oryzae was demonstrated and the effect of pH, Ca^{++} and some organic acids on this inhibition was studied.

Inhibition of α-amylase by chlortetracycline can be removed by citrate, oxalate and other anions of organic acids. The inhibition of α-amylase is reversible.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Literature

Agarvala, S. C., Krishna Murti, C. R., Shrivastava, D. L.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action. I. Effect of Certain Antibiotics on Urease. J. Sci. Industr. Res. 11B : 165, 1952.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action. III. Action of Certain Antibiotics on Amylases. J. Sci. Industr. Res. 11B : 383, 1952.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action. VI. Action of Certain Antibacterial Agents on the Succinic Oxidase System. J. Sci. Industr. Res. 13A : 482, 1954.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action: VII. Action of Certain Antibacterial Agents on Tryptophanase. J. Sci. Industr. Res. 14C : 6, 1955a.

Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action: VIII. Action of Certain Antibacterial Agents on the Tricarboxylic Acid Cycle of Vibrio Cholerae. J. Sci. Industr. Res. 14C : 66, 1955b.

Brody, T. M., Hursitz, R., Bain, J. A.: Magnesium and the Effect of the Tetracycline Antibiotics on Oxidative Processes in Mitochondria. Antibiot. Chemother. 4 : 864, 1954.

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

Van Dyck, P., De Sommer, P.: Production and Extraction Methods of Aureomycin. Antibiot. Chemother. 2 : 184, 1952.

Ghatak, S., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action: IV. Action of Certain Antibiotics on Alkaline Phosphatase. J. Sci. Industr. Res. 12 12B : 160, 1953.

Iyer, S. N., Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action: V. Effect of Certain Antibiotics on Liver Arginase. J. Sci. Industr. Res. 12B : 536, 1953.

Jacobson, K. P., Deodata de Azevedo, M.: Action of Antibiotics on a Peptidase and on Urease. Compt. Rend. Soc. Biol. 148 : 199, 1954.

Loomis, W. F.: On the Mechanism of Action of Aureomycin. Science 111 : 474, 1950.

Van Meter, J. C., Oleson, J. J.: Effect of Aureomycin on the Respiration of Normal Rat Liver Homogenates. Science 113 : 273, 1951.

Saz, A. K., Slie, R. B.: Reversal of Aureomycin Inhibition of Bacterial Cell-free Nitro Reductase by Manganese. J. Biol. Chem. 210 : 407, 1954.

Smith, G. N., Worrel, C. S., Swanson, A. L.: Inhibition of Bacterial Esterases by Chloramphenicol (Chloromycetin). J. Bact. 58 : 803, 1949.

Zimmermann, H. J., Humoller, F. L.: Effect of Aureomycin on Choline Oxidase and Other Enzyme Systems of Rat Liver. Am. J. Physiol. 175 : 468, 1953.

Белозерский, А. Н., Проскуряков, Н. И.: Практическое руководство по биохимии растений. Москва 1951.

Влияние хлортетрациклина на активность α-амилазы

М. БУРГЕР, И. РОКОС и П. ПРОХАЗКА

Резюме

При выработке хлортетрациклина с помощью штамма Actinomyces aureofaciens ферментационная среда содержит обычно источник крахмала, который расщепляется в течение ферментации. Задачей настоящей работы было установить влияет ли накопление, а в особенности значительные концентрации хлортетрациклина в ферментационной среде на деятельность энзимов, вызывающих гидролиз крахмала. Мы установили наличие сильного подавляющего действия хлортетрациклина на α-амилазу Aspergillus oryzae при декстринации

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

крахмала, — при концентрациях, имеющих значение для ферментации антибиотика. Поэтому мы изучали условия, при которых наступает подавление, и способ, как его избежать, — чтобы на основании полученных данных проследить деятельность α-амилазы при образовании хлортетрациклина производственным штаммом A. aureofaciens.

Для опытов мы пользовались энзиматическим препаратом A. oryzae, который в условиях нашего опыта осахаривает крахмал исключительно с помощью α-амилазы.

Активность α-амилазы определялась нами по методу Wohlgemuth-а в нашем видоизменении; сравнение комплекса иод-крахмал со стандартным раствором производилось с помощью колориметра Pulfrich-а.

Мы доказали наличие подавляющего действия хлортетрациклина на активность осахаривания под влиянием α-амилазы плесени A. oryzae при концентрации в $8 \cdot 10^{-4}$ M и выше и исследовали влияние pH, Ca^{++} и некоторых органических кислот на это подавляющее действие.

Подавления деятельности α-амилазы хлортетрациклином можно избежать с помощью цитрата, анионов щавелевой и других органических кислот. Угнетение активности α-амилазы — явление обратимое.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 2.

The Influence of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase of the Production Strain of *Actinomyces aureofaciens*

J. ROKOS, M. BURGER and P. PROCHÁZKA
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received December 20, 1956

In the previous work, the inhibitory influence of chlortetracycline on the α-amylase of the fungus *Aspergillus oryzae* (Burger, Rokos and Procházka 1956) was ascertained. A simple method for counteracting this inhibitory influence was elaborated, by means of which the concentration of α-amylase at a given moment can be measured in a substrate in which chlortetracycline is present.

In the present work a study was made of whether the inhibitory influence of chlortetracycline on the activity of α-amylase also takes effect on α-amylase from other biological sources. In the first place the investigations were directed at ascertaining whether inhibition of the α-amylase of the production strain of *Actinomyces aureofaciens* occurs during the fermentation preparation of chlortetracycline. A study was therefore made of the course of activity of α-amylase during cultivation of the strain producing chlortetracycline and of the degree of inhibition of α-amylase by the antibiotic. Further, the influence of chlortetracycline on the activity of pancreatic α-amylase was studied.

Materials and Methods

Analytical Methods. The analytical methods were described in the previous communication (Burger, Rokos and Procházka 1956). One unit of pancreatic α-amylase corresponds to the amount of enzyme in 1 ml. solution required to dextrinate 1 g. starch in one hour. In the α-amylase of the production strain, one unit is 1,000 times smaller, as it is related to 1 mg. dextrinated starch. The activity is related to 1 ml. of the original solution of the enzymatic preparation. In the case of *Actinomyces aureofaciens* this is 1 ml. filtrate of the culture fluid and in the case of pancreatic α-amylase 1 ml. of the basic solution of the enzyme obtained by purification of the pancreatic extract.

Method. Pancreatic α-amylase was prepared according to the method of Meyer, Fischer and Bernfeld (1947), to the second degree of super-purification. The incubation solutions of pancreatic α-amylase were regulated by means of a phosphate buffer with a final concentration of 7.5×10^{-3}M and contained 0.1 % NaCl. The pH of the solution was maintained at 6.5.

The cultivation conditions of the production strain of *A. aureofaciens* have been described in an earlier communication (Rokos, Ričica and Procházka 1955). The solution of the α-amylase of Actinomyces aureofaciens was obtained by filtering off the culture. The incubation mixtures contained a phosphate buffer with a final concentration of 2.5×10^{-2}M. In all the experiments a constant pH of 6.0 was maintained. The amount of enzymes used in the incubation mixtures was selected in such a way that dextrination of the starch took about 60 minutes. Otherwise the method did not differ from that described in connection with the previous work (Burger, Rokos and Procházka 1956).

Results

The Influence of Chlortetracycline on Pancreatic α-amylase

Chlortetracycline slows down the activity of pancreatic α-amylase in a way similar to that in which it slows down the activity of the α-amylase of the fungus

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

A. oryzae. Fig. 1 shows the course of the transmission of the iodine-starch complex during hydrolysis of the starch by pancreatic α-amylase, in the presence and absence of chlortetracycline. The activity of pancreatic α-amylase in the absence of chlortetracycline was 222 units. In the presence of 1,000 μg. chlortetracycline/ml. solution it was 60 units.

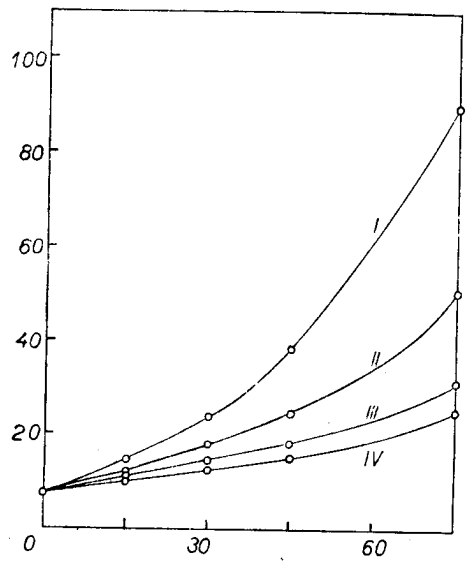


Fig. 1. Influence of concentrations of chlortetracycline on the inhibition of pancreatic α-amylase. x: time in minutes. y: transmission %. I: control, II: 600 μg., III: 800 μg., IV: 1,000 μg. chlortetracycline/ml.

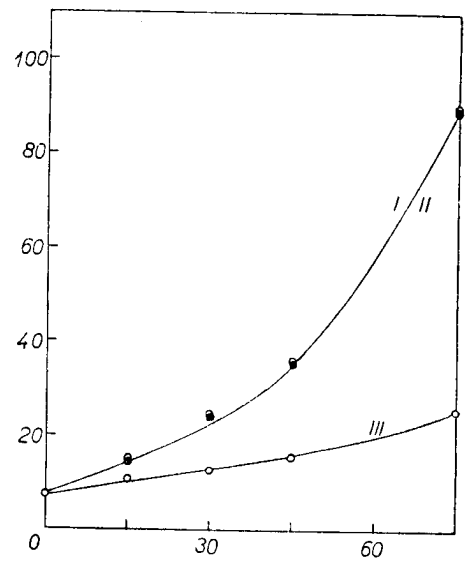


Fig. 2. Influence of citrate on inhibition of pancreatic α-amylase by chlortetracycline. x: time in minutes. y: transmission %. Final concentration of Na citrate 2 . 10^{-2}M. I: control, II: 1,000 μg. chlortetracycline and Na citrate, III: 1,000 μg. chlortetracycline/ml.

In the previous communication it was demonstrated that inhibition produced by chlortetracycline can be counteracted by citrate and other anions of organic acids. In the case of this amylolytic system it was also investigated whether citrate would have the same effect. Fig. 2 shows that the presence of citrate, in the same concentration as used in the previous work, abolishes the inhibitory effect of chlortetracycline. The inhibitory effect of chlortetracycline on pancreatic α-amylase, therefore, displays the same features as in the case of α-amylase from *A. oryzae.*

The Influence of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase of the Production Strain of *Actinomyces aureofaciens*

It is known from the work of several authors (Bois and Savary 1945, Waksman 1950) that a number of actinomycetes produce α-amylase. Simpson and McCoy (1953) studied the production of α-amylase in five species of actinomycetes. These authors found that the starch in the substrate was hydrolysed only by α-amylase, while maltase was not present. The production of α-amylase was not studied, however, in the production strain of *A. aureofaciens.* In this strain, the presence of α-amylase in the substrate was also determined, but maltase was not ascertained. Our preceding experiments showed that in this case inihibition of α-amylase by chlortetracycline must be reckoned with. Before studying the course of the activity of α-amylase

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

during cultivation of *A. aureofaciens*, therefore, the effect of adding chlortetracycline to the solution was first observed, together with an investigation of whether possible inhibition could be abolished by citric acid.

To a filtrate of fermentation fluid from a 72-hour culture, 1,000 μg. chlortetracycline was added to 1 ml. final volume of substrate and the degree of inhibition was

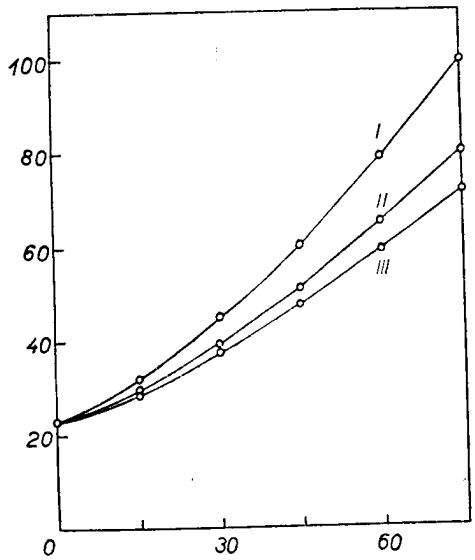


Fig. 3. Influence of chlortetracycline on activity of α-amylase of *Actinomyces aureofaciens* and influence of citrate on inhibition of α-amylase of *Actinomyces aureofaciens* by chlortetracycline. x: time in mins. y: transmission %. Final concentration of Na citrate $2 \cdot 10^{-2}$M. I: control, II: 1,000 μg. chlortetracycline and Na citrate, III: 1,000 μg. chlortetracycline/ml.

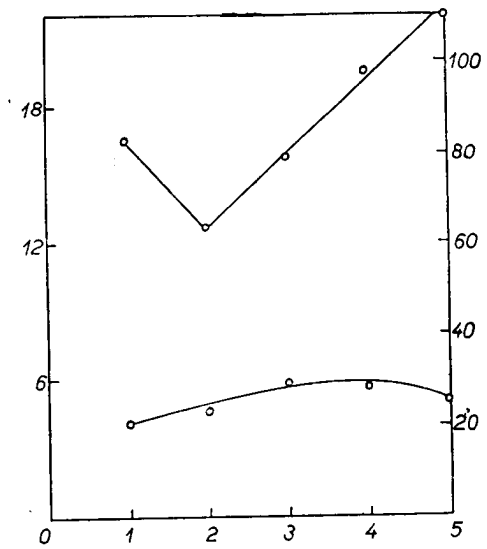


Fig. 4. Course of activity of α-amylase of *Actinomyces aureofaciens* and inhibition by chlortetracycline during cultivation. x: fermentation in days; activity and inhibition determined at 24-hour intervals. y_0: units of α-amylase activity, y_5: inhibition of α-amylase by chlortetracycline as a % of decrease in activity as compared with the control. Above: course of activity of α-amylase, below: course of measure of inhibition of α-amylase of *A. aureofaciens* during cultivation.

determined. In a parallel experiment citric acid was also added. Fig. 3 shows that the same concentration of chlortetracycline inhibited the α-amylase of the production strain of *A. aureofaciens* far less than the α-amylase of *A. oryzae* and pancreatic α-amylase. In this case, chlortetracycline reduced activity by only 26%. The addition of citric acid also had only very little effect.

These results show that the α-amylase of a strain of *A. aureofaciens* producing chlortetracycline differs basically from fungous and pancreatic α-amylase as regards inhibition by chlortetracycline.

The course of the activity of α-amylase of the production strain of *A. aureofaciens* during submerged fermentation of chlortetracycline on a reciprocal shaker is shown in fig. 4 and tab. 1. Fig. 4 shows that the addition of 1,000 μg. chlortetracycline to a filtrate of the culture reduced activity on an average by 25%.

Discussion

It is known (Waksman 1950) that when culturing actinomycetes on a starchy substrate, α-amylase accumulates in the medium. Simpson and McCoy (1953) made a detailed study of the type of the amylolytic ferments in a number of strains of

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Table 1. Course of activity of α-amylase of *Actinomyces aureofaciens* during fermentation, inhibition of α-amylase by chlortetracycline and abolishment of inhibition of α-amylase by citric acid.

Production of chlortetracycline during fermentation

Hours of fermentation	Production of chlortetracycline in μg.	Additions		
		0 (controls)	chlortetracycline	chlortetracycline + citric acid
24	—	16.6	13.2	13.1
48	1,210	12.7	9.7	9.7
72	1,430	15.8	11.6	13.1
96	1,030	19.5	13.9	16.0
120	—	22.1	16.4	17.3

Final concentration of added chlortetracycline $2 \cdot 10^{-3}$M.
Final concentration of Na citrate $2 \cdot 10^{-2}$M. Expressed in α-amylolytic units.

actinomycetes. They found that these strains produced a typical α-amylase, but not maltase. In the production strain of *A. aureofaciens*, amylase was also found alone in the substrate, without maltase. The course of the activity of this enzyme during fermentation of chlortetracycline is given in the experimental part of the communication.

In contrast to the study of the amylases of non-productive strains, the question arose in connection with the productive strain of whether the chlortetracycline which accumulates in the substrate does not influence the activity of the α-amylase. This appeared to be probable, when considering that concentrations of chlortetracycline from 400 μg./ml. upwards had an inhibitory effect on α-amylase from other sources, e. g. from the fungus *A. oryzae* and pancreatic α-amylase. By means of the method for abolishing inhibition (acids, dialysis) it was found that in very high concentrations (1,400 μg./ml.) chlortetracycline had very little effect on the activity of α-amylase of the production strain.

The α-amylase of the production strain is quite different, therefore, from the α-amylase of the fungus *A. oryzae* and pancreatic α-amylase in its relationship to chlortetracycline. This is an interesting fact, when we consider that the mechanism of the decomposition of starch by α-amylases from various sources is fundamentally the same (Myrbäck 1951). It is known, however, that in some respects the various α-amylases nevertheless differ (e. g. as regards optimal pH and temperature, relationship of dextrination and saccharification, affinity to varying lengths of chains in the substrate, etc). Some properties of α-amylases are labile and depend on the culture conditions. Campbell (1955) found that the α-amylases of thermophilic facultative bacteria, when cultured at various temperatures, differed only in their resistance to high temperatures. When cultured at 55° C, isolated and super-purified α-amylase was resistant to a temperature of 90° C, but after being cultured at 30° C (under otherwise the same conditions) the α-amylase lost this resistance. It is very probable that in our case also the resistance of α-amylase to chlortetracycline is due to an adaptive change in the α-amylase as a result of the influence of the chlortetracycline in the medium. It will therefore be important to ascertain whether the α-amylase of a non-productive strain will display the same characteristics in this connection as the α-amylase of the productive strain.

It was found that in the early phase of cultivation of the production strain the general metabolism of the strain is affected if chlortetracycline is added in a given concentration (Boretti and Raggi 1955). At this stage chlortetracycline influences metabolism in a number of ways. It will be of interest to determine whether, at this

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

stage, manifestations of adaptation do not occur in some enzymatic systems under the influence of chlortetracycline. Our work indicates that such an effect might occur in the α-amylase of the production strain. A direct reply to this question is expected from a comparison of the influence of chlortetracycline on the α-amylase of the productive and non-productive strains of *A. aureofaciens*; this will be the subject of the further work.

The results demonstrate that in the production of chlortetracycline inactivation of the enzymatic system responsible for the decomposition of starch does not occur and that in this respect the prerequisite conditions are present for the complete utilization of the carbohydrate substrate (i. e. also of starch) during fermentation.

In the course of treatment with chlortetracycline, digestive difficulties are known to develop (McLean 1951, Kleitsch 1951, Leland et al. 1951, Müller and Vogl 1952, Siegel 1952). It may be assumed that these symptoms are due to the complex action of chlortetracycline. The fact that in experiments in vitro chlortetracycline was found to have a strong inhibitory effect on pancreatic α-amylase, which could be abolished by citrate, will stimulate the authors to investigate in detail the question of whether the above-mentioned symptoms are not due, at least in part, to inhibition of the digestive enzymes in the alimentary tract and whether they cannot be abolished or at any rate mitigated.

Summary

The inhibitory influence of chlortetracycline on the dextrination activity of pancreatic α-amylase was demonstrated. This inhibition is reversible and can be abolished by the anions of organic acids. On the other hand it was found that high concentrations of chlortetracycline (1,400 μg./ml.) have very little effect on the activity of the α-amylase of the production strain of *A. aureofaciens*. This α-amylase, therefore, is quite different from the α-amylase of the fungus *Aspergillus oryzae* and from pancreatic α-amylase in its relationship to chlortetracycline. A study was made of the course of the activity of α-amylase during fermentation of chlortetracycline by the production strain of *Actinomyces aureofaciens*.

References

Bois, E., Savary, J.: Les amylases des microorganismes. Can. J. Research B 23 : 208, 1945.

Boretti, G., Raggi, F.: Effetto della chlortetraciclina sulla respirazione dello Streptomyces aureofaciens. Giorn. Microb. 1 : 224, 1955.

Burger, M., Rokos, J., Procházka, P.: Effect of Chlortetracycline on the Activity of α-amylase. Fol. biol. (Praha) 2 : 320, 1956.

Campbell, L. L., Jr.: Purification and Properties of an α-amylase from Facultative Thermophilic Bacteria. Arch. Bioch. Biophys. 54 : 154, 1955.

Kleitsch, W. P.: Fatal Gastric Hemorrhage Following Aureomycin. Am. J. Digest. Dis. 18 : 166, 1951. Ref. J. A. M. A. 147 : 83, 1951.

McLean, G.: Aureomycin Administered with Antacids. Am. J. Digest. Dis. 18 : 35, 1951. Ref. Am. Profess. Pharm. 17 : 832, 1951.

Leland, J. L., Allebach, N.: Aureomycin and Penicillin in the Treatment of Bacterial Pneumonia. A Comparative Study. N. Y. St. J. Med. 51 : 1159, 1951. Ref. Abstr. World Med. 10 : 517, 1951.

Meyer, K. H., Fischer, E. H., Bernfeld, P.: Sur les enzymes amylolytiques I. L'isolement de l'alpha amylase de pancréas. Helv. Chim. Acta 30 : 64, 1947.

Müller, R., Vogl, H.: Nebenwirkungen von Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin. Ref. Ars. Med. 42 : 179, 1952.

Myrbäck, K., Neumüller, G.: Ergebnisse der Enzymforschung. Leipzig 12, 1951.

Rokos, J., Řičica, J., Procházka, P.: Studium produkce chlortetracyklinu u Actinomyces aureofaciens I. Čs. biologie 4 : 333, 1955.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Siegel, A. C.: The Rectal Administration of Aureomycin in Children. New England J. Med. 246 : 447, 1952. Ref. Medical Times 80 : 727, 1952.
Simpson, F. J., McCoy, E.: The Amylases of Five Streptomycetes. Appl. Microbiol. 1 : 228, 1953.
Waksman, S. A.: The Actinomycetes. Waltham, Mass. 1950.
Рокос, И., Ржичица, Я., Прохазка, П.: Изучение продукции хлортетрациклина у Actinomyces aureofaciens. I. Fol. biol. (Praha) 1 : 214, 1955.

Влияние хлортетрациклина на активность α-амилазы производственного штамма Actinomyces aureofaciens

И. РОКОС, М. БУРГЕР и П. ПРОХАЗКА

Резюме

Мы изучали подавляющее действие хлортетрациклина на α-амилазу из поджелудочной железы и на α-амилазу штамма Actinomyces aureofaciens, образуемую им при глубинной культивации. С помощью выработанного нами простого метода возможно устранить его подавляющее влияние и измерять концентрацию α-амилазы в данную минуту непосредственно в субстрате, в присутствии хлортетрациклина.

Мы доказали также подавляющее действие хлортетрациклина на декстринирующую активность панкреатической α-амилазы. Это подавление оказывается обратимым и устраняется также анионами органических кислот.

С другой стороны, мы установили, что хлортетрациклин и при очень высоких концентрациях (1400 γ/мл) оказывает лишь незначительное действие на активность α-амилазы производственного штамма A. aureofaciens. Таким образом, по влиянию на нее хлортетрациклина эта амилаза весьма отличается от α-амилазы плесневого грибка Aspergillus oryzae и поджелудочной железы. Это обстоятельство тем более интересно, что метаболизм расщепления крахмала α-амилазами из различных источников в принципе одинаков.

Возможно, что в нашем случае устойчивость α-амилазы к хлортетрациклину обусловлена адаптивными изменениями α-амилазы под влиянием хлортетрациклина в среде.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

К проблеме фильтрующихся форм бактерий

Д. БЛАШКОВИЧ, В. БЫСТРИЦКИЙ, Б. СТЫК, и В. КОВАРОВА
при техническом сотрудничестве Я. РАУСА и И. ГЛАВАЧОВОЙ
Вирусологический институт ЧСАН, Братислава

Поступило в редакцию 3 XI 1955

Изучение условий возникновения и особенностей фильтрующихся форм бактерий должно производиться в связи с обстоятельствами, сопровождающими их возникновение. Мы говорили о них в своем обобщающем реферате (Блашкович и Быстрицкий 1955а). Собранный до сих пор опыт показал, что в природе фильтрующиеся формы бактерий появляются тогда, когда бактерии долго живут в организме и долго находятся под влиянием очень сложных и трудно определимых условий среды живого организма. В условиях опыта, главным образом при выращивании в искусственных питательных средах, они возникают в результате влияний, которые называют неблагоприятными. Сюда относится действие антибиотиков, солей лития, иммунной сыворотки, бактериофага, механического разрушения, перемежающегося замораживания и размораживания культуры или длительного выращивания в одной и той же питательной среде, содержащей стареющие и уже распадающиеся микробы, и т. п. При оценке некоторых факторов, которые признаются решающими для возникновения фильтрующихся форм бактерий in vitro, не следует забывать, что такие же условия могут создаваться и в организме, способствуя также их возникновению (состояние иммунитета, действие бактериофага, антибиотиков и т. п.). Напоминая об этом, мы не отождествляем, конечно, сравнительно упрощенные условия in vitro с условиями, с которыми микробы сталкиваются в живом организме или в природе вообще.

Настоящая сводка трех отдельных трудов представляет разработку той части проблемы, в которой на основе полученных до сих пор данных исследовались внешние условия, необходимые для возникновения фильтрующихся форм бактерий, и выяснялось, какие морфологические изменения происходят в клетке бактерии под действием пенициллина и других факторов. В качестве модели мы избрали палочку Пфейфера, — паразита и сапрофита человека, — склонность которой к образованию L-форм была уже нами описана и с которой у нас уже имелся опыт экспериментально-патогенетической работы (Блашкович 1942).

I.

В первую очередь мы хотели проверить, представляют ли фильтрующиеся формы бактерий обязательную стадию их онтогенеза (Калина 1951). В этом случае мы должны были бы их найти в ходе размножения бактерий при условиях, которые ничем не препятствуют развитию этого процесса.

Материал и методы

1. *Выбор штаммов.* Мы производили опыты с 3 штаммами палочки Пфейфера, изолированными в случаях воспаления оболочек головного мозга у детей: Н 11, Н 23 и Н 25. Два из них вели себя в эксперименте как b-тип. Путем пассажей на молодых кроликах, весом в 480—880 г, вирулентность и токсичность штамма Н 23 повысились настолько, что 0,2 мл крови заражен-

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

ного им кролика в течение 24 час. убивали животное весом в 700 г при картине геморрагической септикемии. Кроме того мы работали с 6 штаммами, изолированными из дыхательных путей.

2. *Питательная среда.* Кроме лабораторных животных, в теле которых палочка Пфейфера размножалась очень сильно, мы использовали в качестве питательной среды амниотическую и аллантоисную полости 9—12-дневных куриных зародышей, в которых мы культивировали палочку в 10 последовательных пассажах.

Зараженные жидкости мы фильтровали через фильтр Berkefeld-a L-3 или же L-5. Следующей питательной средой был бульон из печени с прибавлением 3,3% или 8,3% гемолизированной кроличьей крови. Эти культуры мы фильтровали через фильтр Seitz-a и исследовали фильтраты на присутствие фильтрующихся форм.

Результаты исследований

1. *Попытка получения фильтрующихся форм из инфекционного материала павших кроликов.*

Органы кролика, погибшего после прививки палочки Пфейфера, а именно кровь, части легких, печени и селезенки с большим содержанием микробов, растирались в ступке с физиологическим раствором 1 : 8. Отстоявшийся экстракт фильтровался через фильтр Seitz-a. Фильтрат был обозначен литерой А.

Из экстракта было получено еще 2 фильтрата: первый (В) — это была часть жидкости над осадком после центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15 мин., второй (С) — остаток надосадочной жидкости, отстаивавшейся в течение 24 час. при 4° С. Экстракты В и С также фильтровались через фильтр Seitz-a.

Все 3 образца фильтратов были свободны от бактерий. Фильтрат А был посеян на поверхность 10% кровяного агара. После того как фильтрат просачивался в среду, на ее поверхность наносились микроколонии желтого стафилококка. Среда заклеивалась для закрытия доступа воздуха. 15-дневная инкубация при 37 °С не приносила роста колоний. Они не появлялись даже тогда, когда поверхность среды вокруг стафилококка соскабливалась и наносилась на свежий 10% кровяной агар с колониями стафилококка.

Молодой кролик, которому 0,15 мл фильтрата А было введено в мозг, а 0,9 мл внутривенно, страдал поносом и погиб через 8 дней. Кроме энтерита в его органах не было найдено никаких изменений. Палочка Пфейфера не выросла. В легких была найдена Escherichia coli.

Тот же фильтрат (А) был привит в амнион пяти 12-дневных куриных зародышей по 0,2 мл в каждый. Первый пассаж оказался стерильным, остальные были загрязнены микробами атмосферы.

По 0,5 мл фильтратов В и С было перенесено в жидкую среду (бульон из печени с прибавлением 3,5% крови). Даже после 13-дневной инкубации в жидкой среде в ней не наблюдалось никаких микробов.

2. *Попытка получения фильтрующихся форм палочки Пфейфера путем пассажей на куриных зародышах.*

1 менингеальный штамм палочки Пфейфера и 2 штамма из дыхательных путей были привиты в аллантоис 9—12-дневных куриных зародышей. Во всех случаях бактерии сильно разрослись.

Каждый штамм прошел не менее 10 таких пассажей. Жидкость от последнего пассажа (около 40 мл) после фильтрации через фильтр Seitz-a засевалась на поверхность 10% кровяного агара и в амниотическую полость 11-дневных куриных зародышей. Через 3 дня их амниотическая жидкость переносилась в амнион свежих зародышей. Так было последовательно произведено 5—6 пассажей. Ни в одном случае не удалось вырастить палочку Пфейфера.

Фильтрат от 10-го пассажа через аллантоисную полость вводился в нос хорькам (по 2 мл) и мышам (по 4 капли). Через 3 дня после прививки животные

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

убивались и из материала слизистой носа, трахеи, а частью и легких приготовлялась эмульсия с физиологическим раствором, которая впрыскивалась новым хорькам или мышам в нос в таких же количествах. 5 последующих пассажей не привело к появлению ни нормальных, ни L-форм палочки Пфейфера. У хорьков в конце концов активировалась Pasteurella.

Из других штаммов палочки Пфейфера, прошедших пассажами через аллантоис куриного зародыша, фильтраты были получены с помощью фильтра Berkefeld-a L-3 или же L-5. Они впрыскивались в аллантоис куриных зародышей. Аллантоисная жидкость переносилась в аллантоисные полости свежих куриных зародышей. Производилось от 2 до 11 пассажей. Ни в одной аллантоисной жидкости, заражавшейся этими фильтратами, палочка Пфейфера не размножани в нормальной, ни в L-форме.

3. *Попытка получения фильтрующихся форм палочки Пфейфера из жидкой среды.*

2 культуры палочки Пфейфера в бульоне из печени с прибавлением 3,3% гемолизированной кроличьей крови фильтровались после 3-дневной инкубации через фильтр Seitz-a. Фильтрат засевался как в свежую среду того же состава, так на 10% кровяной агар со стафилококком. После 9-дневной инкубации обе среды оставались стерильными.

4. *Морфология палочки Пфейфера, выращивавшейся в куриных зародышах.*

Форма палочки Пфайфера, размножавшейся в аллантоисной полости куриного зародыша, изучалась нами с помощью светового и электронного микроскопов. Найденные нами формы ничем не отличались от форм палочки, выращивавшейся на кровяном агаре, о которых говорилось в нашей предшествовавшей работе (Блашкович и Быстрицкий 1955б).

II.

После безуспешных попыток получить фильтрующиеся формы палочки Пфейфера из фильтратов среды, в которой бактерии размножались очень хорошо, мы пытались вызвать образование L-цикла, опираясь на работы Tulasne (1951), Dienes (1947), Паточки и Сухановой (1951), Пермута и Нечаса (1954, 1955). Опыты мы довели до той стадии морфологических изменений, при которой мы убедились в возникновении т. н. L-цикла у палочки Пфайфера под влиянием различных факторов.

Материал и методы

1. *Выбор штаммов.* Мы работали с 2 штаммами палочки Пфейфера менингеального происхождения и с 3 штаммами, изолированными из дыхательных путей. Это были те же штаммы, что и в предыдущем опыте.

2. *Питательная среда.* a) *Плотная среда.* Перечень применявшихся в опыте видов питательной среды приводится без особой спецификации, в расчете на то, что они общеизвестны. Это т. н. шоколадный агар, обогащенный 1% proteose-pepton Difco № 3, 20% стерильной инактивированной лошадиной сыворотки, 10% дрожжевого экстракта и 15% бараньей крови.

Пенициллин, вызывающий L-цикл, мы наносили в желобок (2000 ед/мл) или на поверхность агара (150—375 ед/мл).

Палочку Пфейфера мы выращивали аэробно или полуанаэробно, с культурой S. marcescens или без нее. Техника посевов бывала всегда одна и та же: мы наносили исследуемую культуру штрихами, параллельными с желобком.

b) *Жидкая среда.* Мы пользовались говяжьим бульоном с прибавлением 10% дрожжевого экстракта, 20% лошадиной сыворотки и 20% кроличьей крови. К этой среде мы прибавляли пенициллин (1, 10, 50, или 100 ед/мл), или же гамма-глобулин, полученный из сыворотки кроликов, иммунизированных палочкой Пфейфера.

c) Т. н. *RM-среда* представляла смесь плотной и жидкой среды в пробирке (косой шоколадный агар с жидкой фазой, содержавшей бульон с 10% дрожжевого экстракта и 20% лошадиной сыворотки).

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

d) Препараты для светового микроскопа вырезались из плотной среды по методу Dienes и Smith-a (1944) и окрашивались красителем Giemsa, разведенным на 1 : 200, в течение 2 часов.

e) *Гипериммунная сыворотка и гамма-глобулин* приготовлялись путем иммунизации кроликов и крыс инактивированной культурой палочки Пфейфера; гамма-глобулин из гипериммунных кроличьих сывороток—путем преципитации сыворотки при —4° С с 25% спирта и растворения в физиологическом растворе.

Результаты исследований

1. *Образование L-форм палочки Пфейфера в зависимости от продолжительности действия пенициллина.*

При нанесении пенициллина в желобок в питательной среде следует при описании образования L-колоний принимать во внимание фактор времени, играющий свою роль при просачивании антибиотика в питательную среду.

Мы исследовали 5 штаммов палочки Пфейфера. Все они под действием пенициллина образовали L-формы. Частичный анаэробиоз ускоряет образование крупных круглых телец (ККТ), а тем самым и L-колоний (использование S. marcescens, заклейка чашек Петри).

Сжатый обзор L-цикла палочки Пфейфера на шоколадном агаре с пенициллиновым желобком выглядит на оттисках и мазках, окрашенных по Giemsa, следующим образом:

В течение 2 час. после посева культуры палочки Пфейфера на поверхность шоколадного агара колонии не образовались. Форма микробов не менялась.

Через 4 часа после посева штриховкой под лупой местами заметен на штрихах налет микробов. У штамма из верхних дыхательных путей морфологические изменения микробов в скоплениях не наблюдаются, у менингеального штамма заметны выдающиеся из тела бактерии отростки, утолщения и образование круглых телец (таб. I, рис. 1 и 2).

Через 6 час. после посева в лупу по всей поверхности агара заметны мелкие, едва различимые колонии. Несколько десятков или сотен микробов в поле зрения микроскопа образуют микроколонии. Микробы растут в длину, отличаются неправильными, утолщенными частями тела и образуют ККТ. Иногда встречаются отдельные тельца. ККТ бывают однородные, синефиолетового цвета (таб. I, рис. 3 и таб. II, рис. 4).

Через 8 час. после прививки по соседству с желобком с пенициллином находятся мелкие, едва различимые колонии, а подальше от пенициллина они бывают гораздо крупнее. У штамма из верхних дыхательных путей ККТ образуются вблизи желобка в большом количестве только теперь, тогда как у менингеального штамма они уже сформировались, и в некоторых из них начинается вакуолизация.

Через 12 час. после посева наблюдаются колонии переходного типа, а также колонии чистых ККТ в различных стадиях развития, — от однородных до вакуолизированных и сегментированных многочисленными перегородками. Колонии, удаленные от желобка с пенициллином, бывают меньше 0,1 мм (таб. I, рис. 5 и таб. II, рис. 6).

Через 24 часа после посева поблизости от пенициллина находятся одни только L-колонии, состоящие из L-телец, — по большей части вакуолизированных. Бросается в глаза морщинистая поверхность этих колоний в сравнении с гладкими сферическими колониями вдалеке от пенициллина (таб. III, рис. 7).

Через 36 час. после посева вблизи пенициллина находятся, главным образом, распавшиеся L-колонии, распавшиеся ККТ и множество мелкозернистого вещества вокруг колоний. Несколько дальше от желобка, среди нормальных гладких колоний встречаются и мелкие колонии с изборожденной поверхностью.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Через 48 час. после посева рядом с желобком пенициллина наступает распад L-колоний. Большинство ККТ распадается, в других наблюдаются мелкие зернистые образования или кроткие, правильные коккобациллярные тельца, окрашивающиеся краснофиолетовым. Но кроме них вокруг ККТ и остатков L-колоний находится множество бесформенного зернистого вещества и хорошо сформированных палочек и волокон. Мы полагаем, что это микробы, которые возникают из некоторых распадающихся ККТ в питательной среде, где концентрация пенициллина упала настолько, что уже не вызывает образования новых ККТ и L-циклов. Возникающие так микробы не устойчивы по отношению к пенициллину и в присутствии достаточного количества этого антибиотика немедленно переходят в L-циклы (таб. IV, рис. 9).

Вдали от пенициллина наблюдаются т. н. переходные L-колонии (Паточка и Суханова 1951), происхождение которых мы объясняем так, что уже возникшие нормальные колонии постепенно изменяются в L-колонии, начиная с наиболее старых микробов (таб. III, рис. 8).

Через 72 часа после посева на поверхности среды находится 2 вида колоний: нормальные и L-колонии. Колония, взятая с любого места (вблизи или вдалеке от пенициллина) и перенесенная на 10% кровяной агар, дает начало чистой культуре нормальных колоний палочки Пфейфера. Большинство L-колоний находится в состоянии распада. Вдали от желобка расположены вперемежку т. н. переходные колонии и L-колонии.

Через 96 час. после посева картина такая же, как и через 72 часа. Колонии представлены двумя типами: L-колониями и переходными колониями. L-колонии с сотообразной структурой состоят из остатков L-телец с множеством мелкозернистого вещества и с мелкими образованиями в форме палочек яркокраснофиолетового цвета (Giemsa). В мазках при увеличении в 1360 раз кроме ККТ находятся мелкие микробы и волокнистые микробы, а также большое количество мелкозернистого вещества (таб. V, рис. 10).

Через 120 и 144 часа после посева картина культуры отличается от предшествующей только тем, что, кроме распадающихся сотообразных остатков L-колоний в ней находятся и молодые нормальные колонии, состоящие из коротких палочек или волокнистых микробов. В скоплениях фиолетового вещества распавшихся колоний выделяются мелкие краснофиолетовые палочки, возникающие в результате т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951).

Этот опыт, — кроме подтверждения того, что полуанаэробная среда с S. marcescens стимулирует влияние пенициллина на возникновение L-цикла, — принес еще одно открытие: у штаммов палочки Пфейфера, образуемых длинными волокнами (многоядерные клетки — Bisset 1951), L-цикл под действием пенициллина наступает раньше, чем у штаммов в форме коротких палочек.

При долговременных наблюдениях над культурами с пенициллином мы убедились, что там, где после посева все микробы переходили в L-формы, через 4—6 дней начинали появляться нормальные колонии палочки Пфейфера. Специально поставленный опыт показал, что палочка Пфейфера, переходя в L-формы, способна разложить пенициллин в своей округе, так что способные к размножению формы палочки Пфейфера размножаются потом в этих местах путем поперечного деления и дают начало новым нормальным колониям.

2. *Образование ККТ палочки Пфейфера на шоколадном агаре, на поверхность которого был накапан пенициллин.*

ККТ образуются равномерно по всей поверхности среды, побрызганной пенициллином. Культуры палочки Пфейфера брались для исследования через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после посева. Через 6 час. большинство палочек образует уже ККТ, гомогенное содержимое которых интенсивно

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

окрашивается синефиолетовым цветом (таб. II, рис. 4). Изменения бактерий бывали более многочисленными и выразительными при применении 375 ед/мл пенициллина, чем при применении меньших количеств антибиотика (175 ед/мл).

3. *Образование L-колоний и ККТ в старых культурах палочки Пфейфера.*

Мы проследили морфологию аэробной культуры двух штаммов палочки Пфейфера на шоколадном агаре вплоть до 13-го дня культивации. Начиная с 9-го дня, в старых колониях или на их периферии появлялись более темные островки, в которых позднее можно было распознать вторичные колонии, вырастающие на основе первичных. Они не заметны простым глазом. Их можно открыть при разрезе окрашенных блоков. В этих вторичных колониях нами были найдены волокна с ККТ и свободные ККТ. Колонии имели форму переходных L-колоний палочки Пфейфера (таб. V, рис. 11).

4. *Возникновение L-цикла палочки Пфейфера в жидких и смешанных RM-средах.*

Типы жидкой и смешанной RM-среды содержали по 1, 10, 50 или 100 ед/мл пенициллина, или же 20% гамма-глобулина. В них засевалась 0,1 мл взвеси микробов из 48-часовой культуры на кровяном агаре (1 колония на 1 мл физиологического раствора).

Рост в жидких средах контролировался, во-первых, с помощью мазков, а во-вторых, путем пересева на шоколадный агар и разрезания блоков, взятых с мест прививки через 1, 2, 3, 4, 6, 11 и 16 дней после прививки первоначальной жидкости или смешанной среды. Рост проявлялся в виде слабого помутнения. Были получены следующие результаты:

1. Примесь 50 или 100 ед/мл пенициллина к среде препятствовала размножению палочки Пфейфера. Среда с 10 ед/мл до 6-го дня оставалась без признаков роста бактерий, но через 6 дней удавалось вырастить палочку Пфейфера.

2. Образование ККТ в бульонах и RM-среде с пенициллином (1 ед/мл) бывает в сравнении с плотными средами с пенициллином медленнее и менее выразительно. ККТ бывают мельче.

3. Гамма-глобулин (в отличие от плотной среды) в жидких средах и в RM-среде стимулирует развитие L-цикла палочки Пфейфера уже через 24 часа, когда ККТ в жидкой среде с 1 ед/мл пенициллина в общем встречаются редко.

4. RM-среда с гамма-глобулином через 3 дня приводит к дифференциации таких элементов L-цикла, которые после пересева на шоколадный агар дают начало L-колониям.

5. Переходные L-колонии встречаются наряду с нормальными колониями на шоколадном агаре, на который был перенесен материал из среды, содержавшей гамма-глобилин или 1 ед/мл пенициллина, начиная с 6-го дня культивации палочки Пфейфера в этих средах. Таким образом, длительное действие гамма-глобулина или небольших доз пенициллина способно вызвать L-цикл. Прибавление гамма-глобулина в пропорции 1 : 5 к плотным средам не оказывало такого влияния, как в жидких средах.

5. *Рост L-колоний палочки Пфейфера из лиофилизированного материала.*

Менингеальный штамм палочки Пфейфера, который в высушенном состоянии хранился в течение полутора лет при + 4° С, при пересеве на 10% кровяной агар дал во втором пассаже 2 вида колоний: нормальные и едва различимые, серого цвета, с неровной поверхностью и краями и с L-гемолизисом. Это были типичные L-колонии, а именно B-типа, так как через 3 генерации эти колонии вернулись к обычным формам.

Таким образом, мы произвели испытания многочисленных условий при которых образуются L-формы палочки Пфейфера. Полученные нами результаты

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

служат для ориентировки и показывают, в каком направлении итти в поисках биологически активных фильтрующихся форм. Но прежде всего необходимо было проверить вызываемый пенициллином L-цикл с помощью электронного микроскопа.

(Таб. I, II, III, IV, V)

III.

Получив опыт электронной микроскопии палочки Пфейфера (Блашкович и Быстрицкий 1955б), мы сосредоточили свое внимание на L-цикл, вызываемый у нее пенициллином на поверхности плотной среды. Нашей целью было дополнить исследования Кандлера с сотр. (1954), работавшего с Proteus vulgaris, и Tulasne и Brigmann-а (1952) и Dienes (1953), которые для этого вида приводят размеры жизнеспособных фильтрующихся частиц в границах от 170 до 250 mμ. Впрочем в этих случаях речь идет о зафиксированных L-формах, а не о превращении клетки бактерии в L-форму через т. н. ККТ, как это наблюдали в фазовом контрасте Stempen и Hutchinson (1951) и др.

Материал и методы

1. *Выбор штамма.* Менингеальный штамм палочки Пфейфера выращивался на шоколадном агаре, политом раствором пенициллина в концентрации 200 ед/мл. После того, как пенициллин впитывался в среду, на поверхность агара наносилось 0,2 мл 24-часовой культуры палочки Пфейфера (1 колония в 1 мл физиологического раствора).

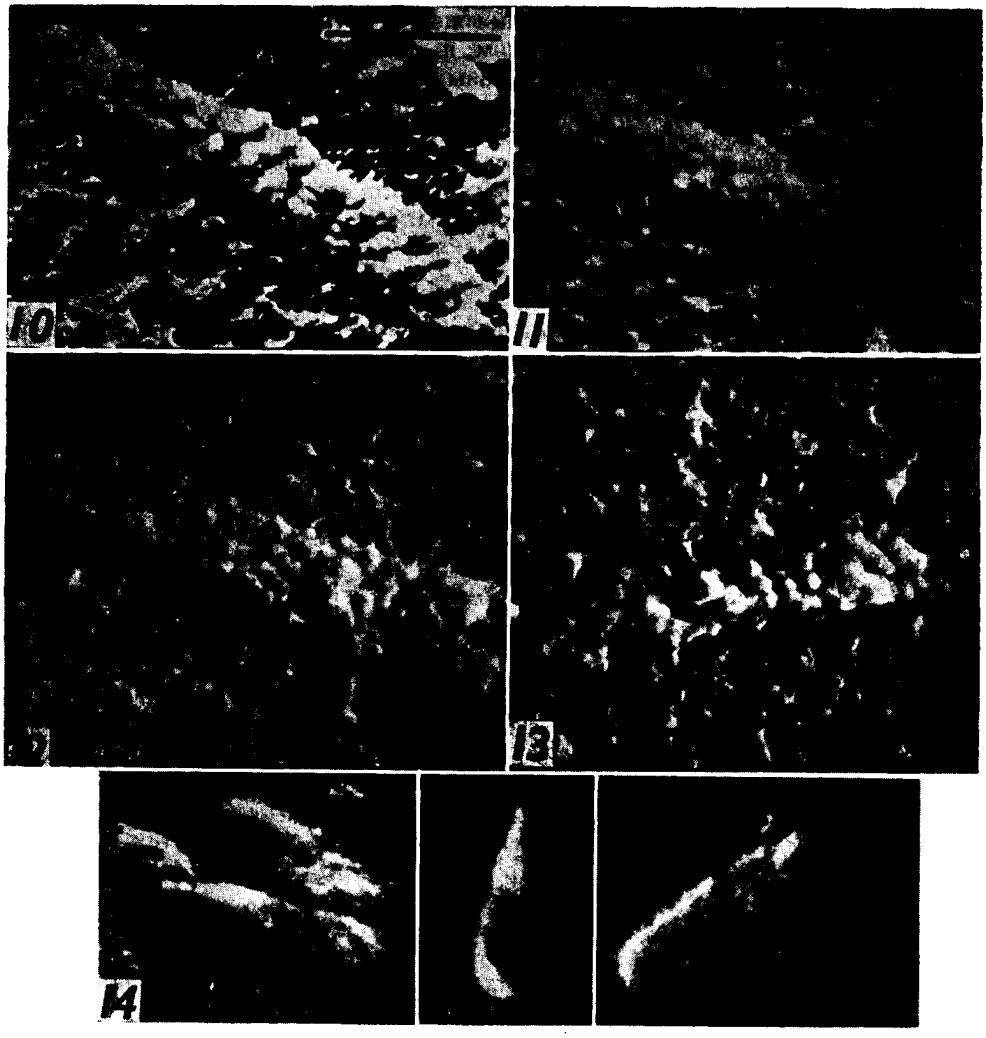
2. *Приготовление препаратов для электронного микроскопа.* Наши усилия были направлены на то, чтобы разработать метод наглядного изображения бактериальных клеток, переходящих в L-цикл, прямо на агаре. С этой целью мы помещали блок, вырезанный из агара, на предметное стеклышко культурой вниз и накапывали на него 3 капли раствора Bouin-а, чтобы колонии или отдельные микроорганизмы отделились от агара. После удаления блока (через 24 часа) препараты фиксировались метиловым спиртом. Часть препаратов мы окрашивали по Giemsa для исследования в световом микроскопе, а вторую часть несколько раз споласкивали дестиллированной водой. Когда препараты просыхали, мы их искоса покрывали хромом (в специальной аппаратуре). Мы брали несколько больше хрома, чем обычно. После этого на препарат наносился слой полистирена (1% раствор в хлороформе). Оттиск, который таким образом превращался, собственно, в негатив («атомная реплика»), мы с помощью полистиреновой пленки снимали в теплой воде. Места с выдавленной поверхностью агара, которые распознаются без труда, мы вырезали ножницами и помещали металлическим слоем вниз на подложные сеточки с коллодиевыми пленками. Вспомогательная полистиреновая пленка растворялась в парах хлороформа или бензена. Препараты изучались с помощью электронного микроскопа марки Siegbahn-Schönander при прямом увеличении в 3000—5000 раз.

Результаты исследований

В 2-часовой культуре мы нашли клетку в начальной стадии образования L-тельца — в форме маленького острого отростка в центре клетки (таб. VI, рис. 1). Правда, в той же культуре встречались и более поздние стадии образования ККТ, так как в посеянной культуре находились клетки различного возраста, т. е. в различной степени реагирующие на действие пенициллина. Рис. 2 на таб. VI представляет несколько более крупный круглый отросток клетки в 6-ом часу инкубации, а рис. 3 на таб. VI — уже сравнительно хорошо развитое ККТ, соединенное с клеткой из 2-часовой культуры. Следующие снимки показывают возникновение ККТ, соединенного с материнской клеткой (6-часовая культура, таб. VI, рис. 4 и таб. VII, рис. 5, 6). В этих тельцах можно различить мелкую зернистость. В 24-часовой культуре ККТ явно еще связаны с остатками клеток (таб. VII, рис. 7). Они отличаются мелкозернистой структурой, но не всегда бывают отчетливо ограничены, что наводит на предположение об их распаде, но только биологический опыт бы мог решить вопрос, приводит ли этот распад к возникновению жизнеспособных мелких телец, или же эти частицы подвергаются автолизу и погибают (таб. VII, рис. 8). Следующий

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2



Таб. VIII а. Палочка Пфейфера. Распад клеток бактерий в зернистость. Рис. 10—13: увеличение в 22.000 раз, рис. 14: увеличение в 15.000 раз.

снимок 24-часовой культуры также изображает остатки бактерии и распадающиеся ККТ (таб. VIII, рис. 9). Среди них видно много мелких частиц, размерами от 100 до 200 mμ. Наблюдая описываемое здесь образование ККТ, мы в 4-часовой культуре видели следующее явление: клетки бактерий — без намека на начинающееся образование L-телец — превращались в гроздья мелких зернышек, приблизительно одинаковых размеров около 100 mμ. Нам случалось наблюдать клетки, сохранявшие первоначальную форму палочки, и однако у них не наблюдалось никакой клеточной оболочки: все их содержимое превратилось в зернистость (таб. VIIIa, рис. 10, 11, 12, 13). Мы пока не можем объяснить этого явления. С помощью описанной нами методики атомных реплик мы приготовили контрольный препарат, исходя из 24-часовой культуры на агаре которая не подвергалась никаким влияниям и которую мы очистили путем

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

центрифугирования в дестиллированной воде. Мазок очищенной взвеси на предметном стеклышке покрывался хромом и снимался полистреном. Снимки атомных реплик таких мазков ясно показывают вполне сохранившуюся бактериальную оболочку (таб. VIII а рис. 14). На основании этого мы судим, что наблюдавшаяся нами зернистость — не артефакт, возникший в связи с методом препаровки. Задачей дальнейших исследований будет проверить, является ли наблюдавшаяся нами зернистость артефактом, или же это распад под действием пенициллина или другой возможной причины.

(Таб. VI, VII, VIII)

Дискуссия

Изучив литературу о биологическом значении фильтрующихся форм бактерий (Блашкович и Быстрицкий 1955а), мы приступили к первой фазе опытов с палочкой Пфейфера для определения условий, при которых возникают фильтрующиеся формы. Прежде всего необходимо было проверить, являются ли фильтрующиеся формы обязательной стадией онтогенеза бактерий (Калина 1951). Поэтому мы стремились получить фильтрующиеся формы в условиях, которые не препятствуют размножению бактерий, — как из лабораторных животных, погибших от острой септикемической инфекции, так и из жидкой среды или из среды развивающегося куриного зародыша (полость аллантоис).

В этих условиях нам не удавалось получить из фильтратов жизнеспособные фильтрующиеся частицы, хотя мы точно следовали методике, описанной Сукневым и Вольферц (1932). Мы знаем, что способные к размножению фильтрующиеся частицы получаются редко (Красильников 1954) и зависят от количества находящихся в засеваемом материале частиц (Klieneberger-Nobel 1951), но, в соответствии с широко поставленными опытами Трнки (1955), мы придерживаемся того взгляда, что возникновение фильтрующихся форм не может быть регулярной стадией в онтогенезе бактерий. Поэтому мы обратились к опытам получения L-форм под действием различных веществ, которые всеми относятся к факторам, влияющим неблагоприятно на процессы жизнедеятельности бактерий, включая и размножение, — так как у L-форм бактерий фильтрующаяся стадия известна.

Мы исследовали влияние на палочку Пфейфера пенициллина и получили результаты, отвечающие тем, которые публиковались до сих пор. Однако мы убедились, что действие пенициллина, просачивающегося сквозь плотную среду, различно в зависимости от того, в какой фазе развития находится сообщество микробов. С очень большой вероятностью мы с помощью метода окрашенных оттисковых препаратов культур палочки Пфейфера различного возраста доказали наличие т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951). А и В-колонии L-форм мы рассматриваем как результат различной длительности действия внешнего фактора (напр., пенициллина). Возможно, что и в природе под действием невполне выясненных причин протекают аналогичные процессы.

Для получения L-форм палочки Пфейфера мы использовали также старые культуры, на базе которых возникают вторичные L-колонии, а также действие специфического гамма-глобулина в жидких и смешанных питательных средах (RM-среда).

В качестве необходимого дополнения к наблюдениям в световом микроскопе мы исследовали возникновение и судьбы L-форм, а в особенности ККТ, и с помощью электронного микроскопа, для чего мы разработали метод атомных оттисков, сохраняющий бактериальные клетки in situ. Мы получили представление о возникновении ККТ, для которого нет необходимости в двух бактериальных клетках, и о составе тела бактерии и ККТ под непрерывным действием

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

пенициллина. При этом мы нашли в теле бактерии и в ККТ крупинки диаметром около 100 mμ, значение которых нам пока неизвестно.

Вышеизложеные исследования должны послужить основанием для работ по вопросам существования и значения фильтрующихся форм палочки Пфейфера.

Резюме

Из литературы предмета мы старались составить себе представление о биологическом значении фильтрующихся форм бактерий. На модели опыта с палочкой Пфейфера мы пытались получить фильтрующиеся её формы или определить условия, при которых они возникают. Мы учитывали результаты биологических опытов и препараты для светового и электронного микроскопов.

В первую очередь мы хотели проверить, являются ли фильтрующиеся формы обязательной стадией онтогенеза бактерий. Мы пытались поэтому получить фильтрующиеся формы палочки Пфейфера из культур менингеальных штаммов (3) и штаммов из дыхательных путей (6). Мы фильтровали через фильтр Seitz-a или Berkefeld-a L-3 и L-5 следующий материал:

а) солевой экстракт органов погибших кроликов, которым был привит менингеальный штамм палочки Пфейфера,

б) культуры штаммов различного происхождения, выращенные в жидких питательных средах и прошедшие не менее, чем 10 пассажами в полости аллантоис куриного зародыша.

Фильтраты засевались на соответственную плотную питательную среду (10% кровяной агар с колониями желтого стафилококка), на жидкую среду (бульон из печени с прибавлением 3,5% крови) и прививались восприимчивым животным (кролик, мышь, хорек) и куриным эмбрионам.

Существование фильтрующихся форм, которые возвратились бы к исходной форме бактерий, не было нами доказано. Не были найдены и фильтрующиеся формы, наличие которых можно было бы отметить с помощью метода «кормилки».

Мы не думаем, что фильтрующиеся формы являются стадией онтогенеза бактерий, размножающихся в благоприятных условиях.

Эти отрицательные результаты направили наше внимание на возникновение L-циклов под действием различных внешних условий.

1. Мы описали действие пенициллина в плотной питательной среде на 5 штаммов палочки Пфейфера, 2 из которых были изолированы в случаях воспаления мозговых оболочек ребенка. Все штаммы образовали ККТ, а у 2 из них путем систематического наблюдения культур в 2-часовых интервалах с большой вероятностью было доказано наличие т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951). Так как пенициллин, прибавляемый к среде в желобок или в отверстие, просачивается в питательную среду постепенно, он оказывает влияние на различные стадии образования колоний, которые, пройдя через стадию переходных L-колоний, через некоторое время приобретают форму типичных L-колоний.

2. Первоначально нормальные колонии палочки Пфейфера, изменившиеся под действием пенициллина в L-колонии, биологически равноценны с устойчивыми или частично стабилизированными A и B-типами L-форм.

3. При L-цикле под влиянием пенициллина палочка Пфейфера разлагает этот антибиотик и тем самым прекращает его антибиотическое действие.

4. L-формы палочки Пфейфера были нами получены в старых культурах на шоколадном агаре, начиная с 9-го дня инкубации. Далее L-формы возникали под влиянием специфического гомологного гамма-глобулина в RM-среде (смесь плотной и жидкой среды). Жидкая среда удобна, как кажется, для получения стабилизованной L-формы, так как вызывающие её образование импульсы действуют в такой среде дольше.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Из лиофилизированных культур палочки Пфейфера также удалось в течение 3 генераций получать L-формы.

Описанные опыты должны способствовать выяснению значения L-цикла у бактерий и решению вопроса, когда в течение этого цикла возникают жизнеспособные фильтрующиеся формы бактерий. Мы хотим так с помощью опыта пролить свет на процессы, протекающие в организме хозяина.

Чтобы проверить данные светового микроскопа при увеличении, позволяющем различать элементарные частицы L-форм бактерий, мы проследили образование ККТ под влиянием пенициллина у палочки Пфейфера и в элктронной микроскопии. Были получены следующие результаты:

Мы наблюдали образование ККТ палочки Пфейфера под действием пенициллина. Из удлиненной палочки вырастает отросток, который увеличивается в объеме и закругляется. Диаметр ККТ бывает около 4—5 микрона. В течение 24 час. исчезают контуры ККТ, которое распадается в зернистость, заметную уже и до этого в содержимом ККТ, или в бесформенную массу.

Кроме образования ККТ мы наблюдали в среде с пенициллином скопления содержимого клетки бактерии в однородную зернистость, утрату клеточной оболочки и рассеяние крупинок в окружающую среду вне клетки. При предшествовавших наблюдениях с помощью электронного микроскопа мы такого распада не наблюдали.

Литература

Блашкович, Д. и Быстрицкий, В.: Морфология палочки Пфейфера (Haemophilus influenzae Pfeiffer) в электронной микроскопии. Fol. biol. (Praha) 1 : 355, 1955б.

Калина, Г. П.: Фильтрующиеся формы бактерий. Труды института микробиологии 1 : 45, Москва 1951.

Красильников, Н. А.: О неклеточных формах у микроорганизмов. Усп. совр. биологии 37 : 22, 1954.

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. I. Изменения формы Proteus vulgaris, вызываемые пенициллином. Чсл. Биология 3 : 370, 1954.

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. II. Влияние анаэробных условий на изменения формы Proteus vulgaris под действием пенициллина. Fol. biol. (Praha) 1 : 257, 1955.

Сукнев, В. В. и Вольферц, Г. А.: Выявление фильтрующихся форм бактерий с помощью «кормилок» из бактериофаговых фильтратов и сущность феномена бактериофагии. Вестник микробиологии, эпид. и паразит., 11, 1932.

Bisset, K. A.: The Morphology and Cytology of Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 5 : 1, 1951.

Blaškovič, D. a Bystrický, V.: Biologický význam filtrovatelných foriem baktérií. Čs. biologie 4 : 496, 1955a

Blaškovič, D.: Über experimentelle Möglichkeiten mit dem b-Typus H. influenzae Pfeiffer. Zbl. Bakter. I. Orig. 149 : 202, 1942.

Dienes, L.: Electron Micrographs Made from L-forms of Proteus and Two Human Strains of Pleuropneumonialike Organisms. J. Bact. 66 : 280, 1953.

Dienes, L., Smith, W. E.: The Significance of Pleomorphism in the Strains of Bacteroides. J. Bact. 48 : 25, 1944.

Kandler, G., Kandler, O.: Untersuchungen über die Morphologie und die Vermehrung der Pleuropneumonieähnlichen Organismen und der L-phase der Bakterien. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 21 : 202, 1954.

Klieneberger-Nobel, E.: Filtrable Forms of Bacteria. Bact. Rev. 15 : 77, 1951.

Patočka, F., Suchanová, M.: Bakteriální cyklus t. zv. L-forem mikrobů. Biol. listy 32 : 90, 1951.

Stempen, H., Hutchinson, W. C.: The Formation and Development of Large Bodies in Proteus vulgaris OX-19. I. Bright Phasecontrast Observation of Living Bacteria. J. Bact. 61 : 321, 1951.

Trnka, Z.: Pokusy o získání nebuněčných forem brucelly kultivací na kuřecím zárodku. Kandidátská práce, Praha 1955.

Tulasne, R., Bringmann, G.: Données nouvelles apportées par le microscope électronique sur la morphologie des formes L des bactéries. Rev. Immunologie, 16 (4—5) : 327, 1952.

Tulasne, R.: Les formes L des bactéries. Rev. Immunologie, 15, 223, 1951.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

On the Problem of Filtrable Forms of Bacteria

D. BLAŠKOVIČ, V. BYSTRICKÝ, V. KOVÁROVÁ and B. STYK

Summary

By studying the literature an attempt was made to form an opinion on the biological significance of filtrable forms of bacteria. In a model experiment with Pfeiffer's Haemophilus influenzae an attempt was made to obtain filtrable forms and, if possible, to define the conditions under which these develop. The results were obtained from biological experiments and from preparations studied by photo and electron microscopy.

In the first place confirmation was sought as to whether filtrable forms develop as an essential ontogenetic stage of bacteria. An attempt was therefore made to obtain filtrable forms of Pfeiffer's Haemophilus influenzae, from cultures of meningeal strains (3) and of strains from the respiratory tract (6). The following material was filtered through a Seitz or a Berkefeld filter L 3 and L 5:

a) a saline extract of the organs of dead rabbits which had been inoculated with a meningeal strain of Pfeiffer's Haemophilus influenzae,

b) cultures of strains of varying origin which had been cultured on fluid nutrient media and had been passed through at least ten passages in the allantoic cavity of the chick embryo.

The filtrates were inoculated on to suitable nutrient media (10% blood agar with colonies of Staph. aureus), fluid media (liver broth with the addition of 3.5% blood), on to sensitive animals (rabbits, mice, ferrets) and on to chick embryos.

The presence of filtrable forms which reverted to the original bacterial form were not demonstrated. Nor were filtrable forms which might be demonstrated by the phenomenon of satellitism.

We are not convinced that filtrable forms of bacteria are an ontogenetic stage of bacteria living in conditions favourable to their multiplication.

Following these negative results attention was paid to the formation of the L-cycle through the action of various external influences.

1. The action of penicillin in solid nutrient media on five strains of Pfeiffer's Haemophilus two of which were isolated in children with meningitis is described. All strains formed large round bodies (LRB) and in two strains, the cultures of which were kept under constant observation at two-hourly intervals, a so-called "incomplete" L-cycle was demonstrated with the greatest degree of probability (Tulasne 1951). When penicillin placed in a cannula or in an opening in the nutrient medium is absorbed into the medium gradually, it has an effect on the bacteria at the various stages of development of the colonies. After a time these take on the form of typical colonies of the L-form, via a transitional L-colony.

2. The originally normal colonies of Pfeiffer's Haemophilus which are changed by the action of penicillin into L-colonies, are not equivalent biologically to stable or partially stabilized A and B types of L-forms.

3. The L-cycle of Pfeiffer's Haemophilus produced by the action of penicillin in turn breaks down the antibiotic and thereby destroys its antibiotic properties.

4. L-forms of Pfeiffer's Haemophilus were obtained in old cultures on chocolate agar from the ninth day of cultivation. L-forms also developed by the action of specific homologous gamma globulin in mixed solid and fluid media (RM environ-

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

ment). Fluid media are perhaps suitable for obtaining a stabilized L-form if the influences evoking it have prolonged action.

L-forms in three generations were also successfully obtained from lyophilised cultures of Pfeiffer's Haemophilus.

These experiments are intended to assist in understanding the significance of the L-cycle of bacteria and in finding out whether viable filtrable forms of bacteria are produced in the course of this cycle. The experimental conditions are arranged in such a way as to approximate to the processes which take place in the host organism.

In order to confirm the findings obtained by photo microscopy, by the use of the highest magnification permitting the elementary particles of the L-forms of the bacteria to be distinguished, the formation of large round bodies of Pfeiffer's Haemophilus by the action of penicillin was also observed by electron microscopy. The following results were obtained:

Using electron microscopy, the formation of large round bodies (LRB) in Pfeiffer's Haemophilus, produced by the action of penicillin, was observed.

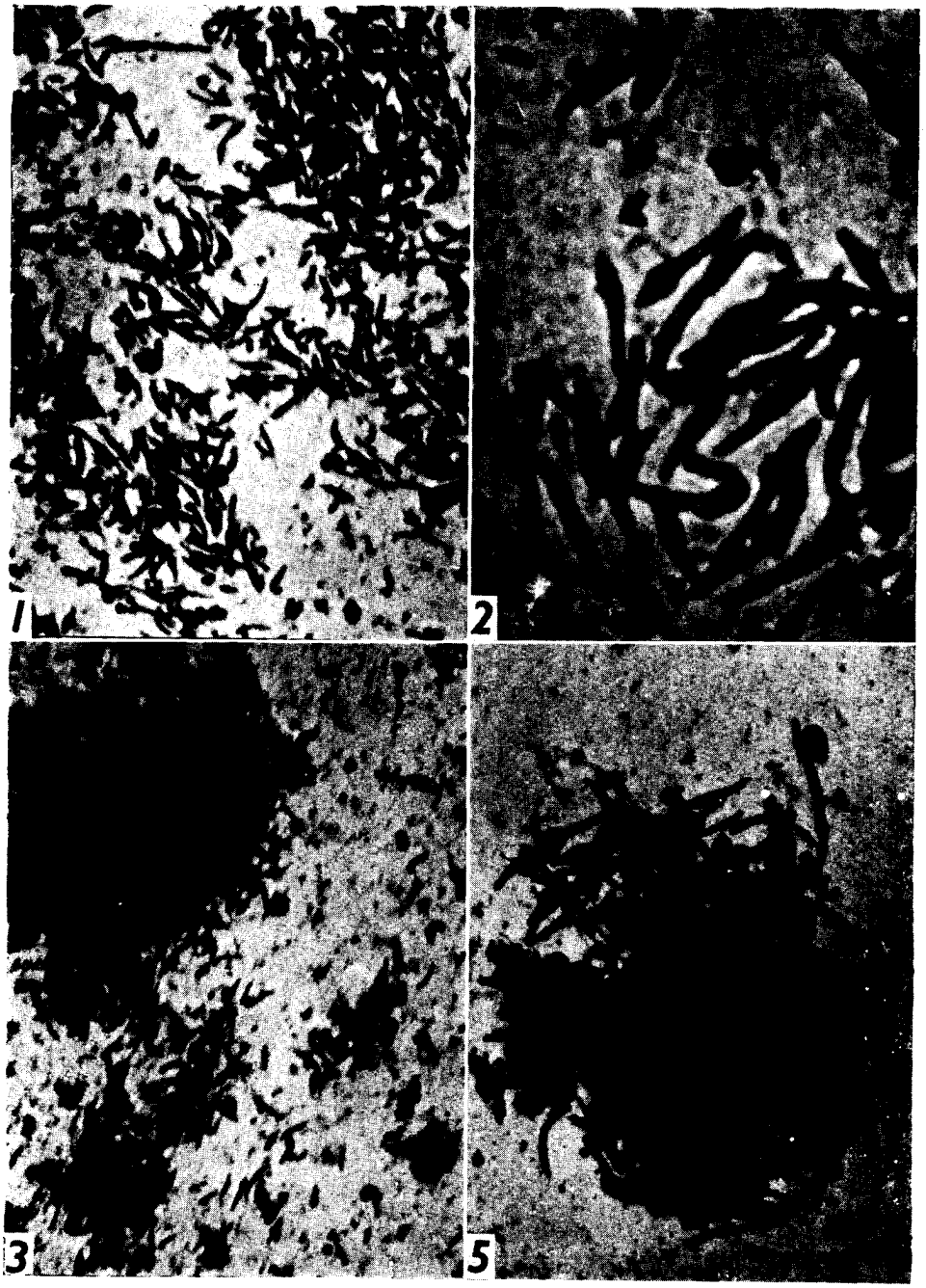
From longer bacilli a process grows out, which increases in size and becomes spherical in shape. The diameter of this large, round body is about 4—5 microns. Within 24 hours the contour of the large round body disappears and it disintegrates into granules which were already previously visible in the contents, or into a formless substance.

In connection with the formation of large round bodies, a grouping of the contents of the bacterial cell into uniform granules, loss of the cell membrane and dispersal of these granules into the medium were observed on media containing penicillin. Such disintegration had not been found in previous observations using electron microscopy.

(Plates I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII)

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2



Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 1. В течение 4-часовой инкубации. На удлиненных палочках и волокнах начинают образоваться ККТ. Увеличение в 950 раз.

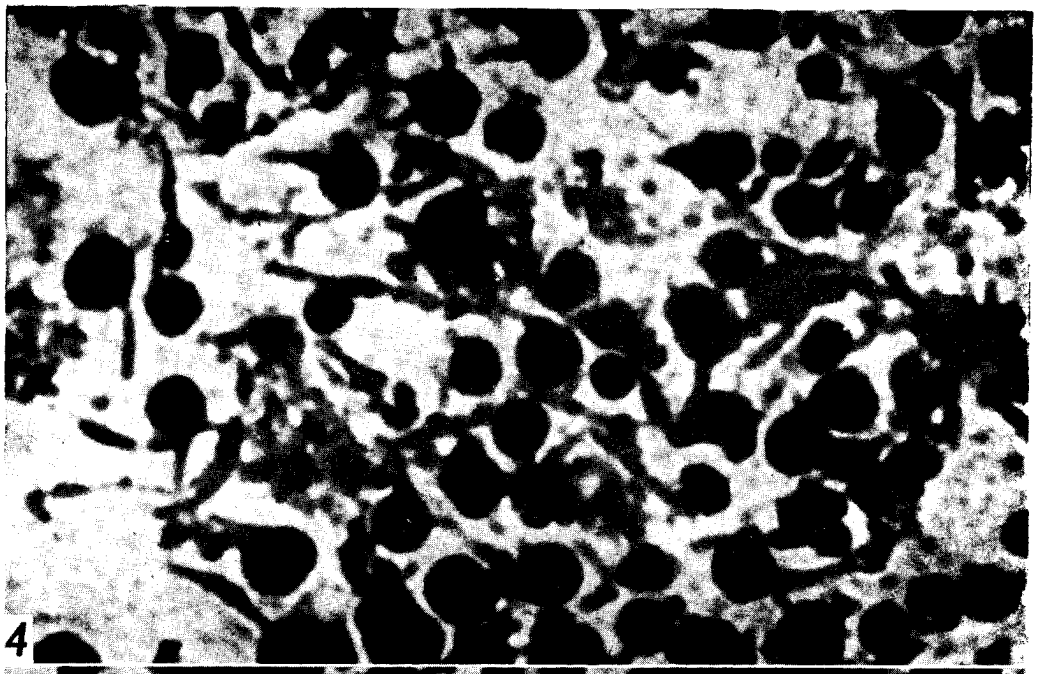
Рис. 2. В течение 4-часовой инкубации. Образование ККТ. Увеличение в 3000 раз.

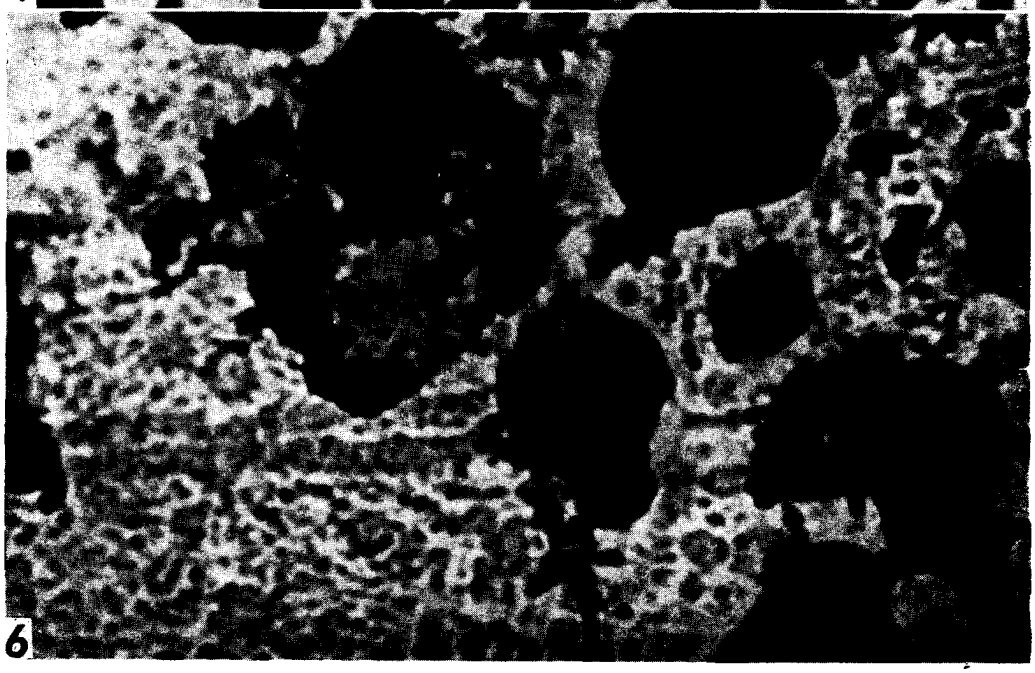
Рис. 3. В течение 6-часовой инкубации. Превращение нормальной колонии в L-колонию. Образование ККТ. Увеличение в 850 раз.

Рис. 5. В течение 12-часовой инкубации. Образование L-колонии и ККТ в колонии волокнистых палочек. Штамм, который при благоприятных условиях культивации имеет форму кокков. Увеличение в 900 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2





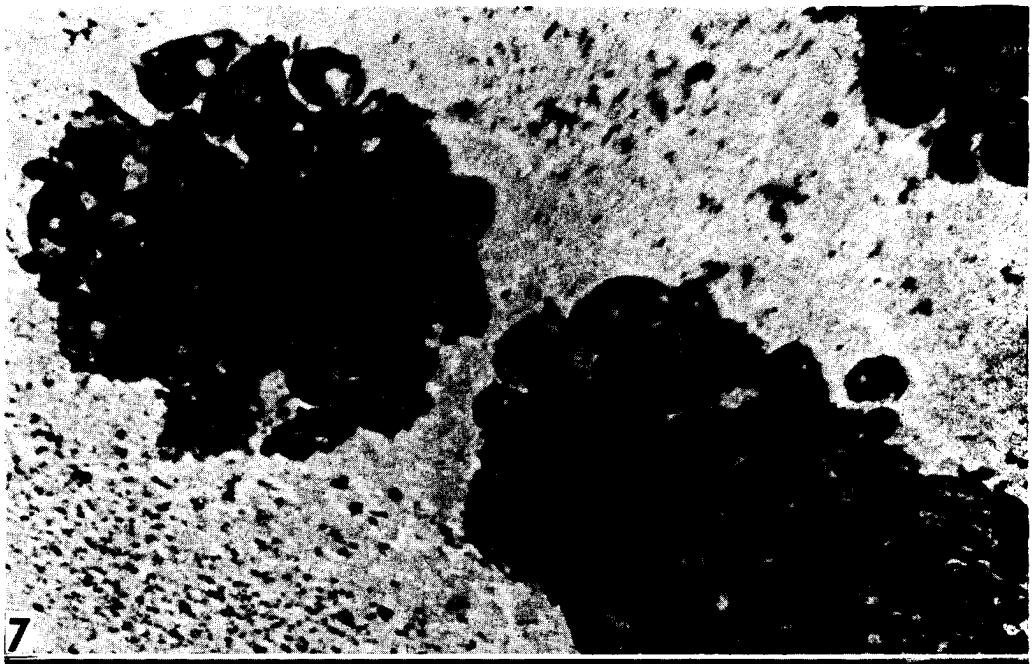
Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 4. В течение 6-часовой инкубации. Большинство палочек образовало ККТ с гомогенным содержимым. Увеличение в 3000 раз.

Рис. 6. В течение 12-часовой инкубации. ККТ в различных стадиях развития. Однородные тельца и вакуолизированные тельца с грануляцией. Увеличение в 3200 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2



Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 7. В течение 24-часовой инкубации. Колония, превратившаяся в L-форму. ККТ в различных стадиях развития. Увеличение в 850 раз.

Рис. 8. В течение 48-часовой инкубации. Вдали от желобка с пенициллином колонии т. н. переходного типа, тогда как ближе к пенициллину находятся L-колонии, а совсем близко от него — распавшиеся L-колонии и остатки распавшихся ККТ. Увеличение в 850 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Рис. 9. 48-часовое действие пенициллина на палочку Пфейфера. Распад ККТ при большом увеличении в 3300 раз.

Снимки 1, 3, 5, 7, 8 и 10 были сделаны с помощью объектива Zeiss Apo 40, 0,95 и окуляра Winkel Zeiss 9, снимки 2, 4, 6 и 9 — с помощью объектива Zeiss Apo 90, 1,30 и окуляра Zeiss Homal IV, 15, снимок 11 — с помощью объектива Zeiss 10, 0,3 и окуляра Winkel Zeiss 9. Микрофотографический аппарат Ultraphot Zeiss, расстояние пластинки от объектива 250 мм. Фотоснимки сделаны д-р мед. Иосифом Шомоди (Somogyi), Гистологический институт университета Коменского, Братислава, за что мы приносим ему свою благодарность.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

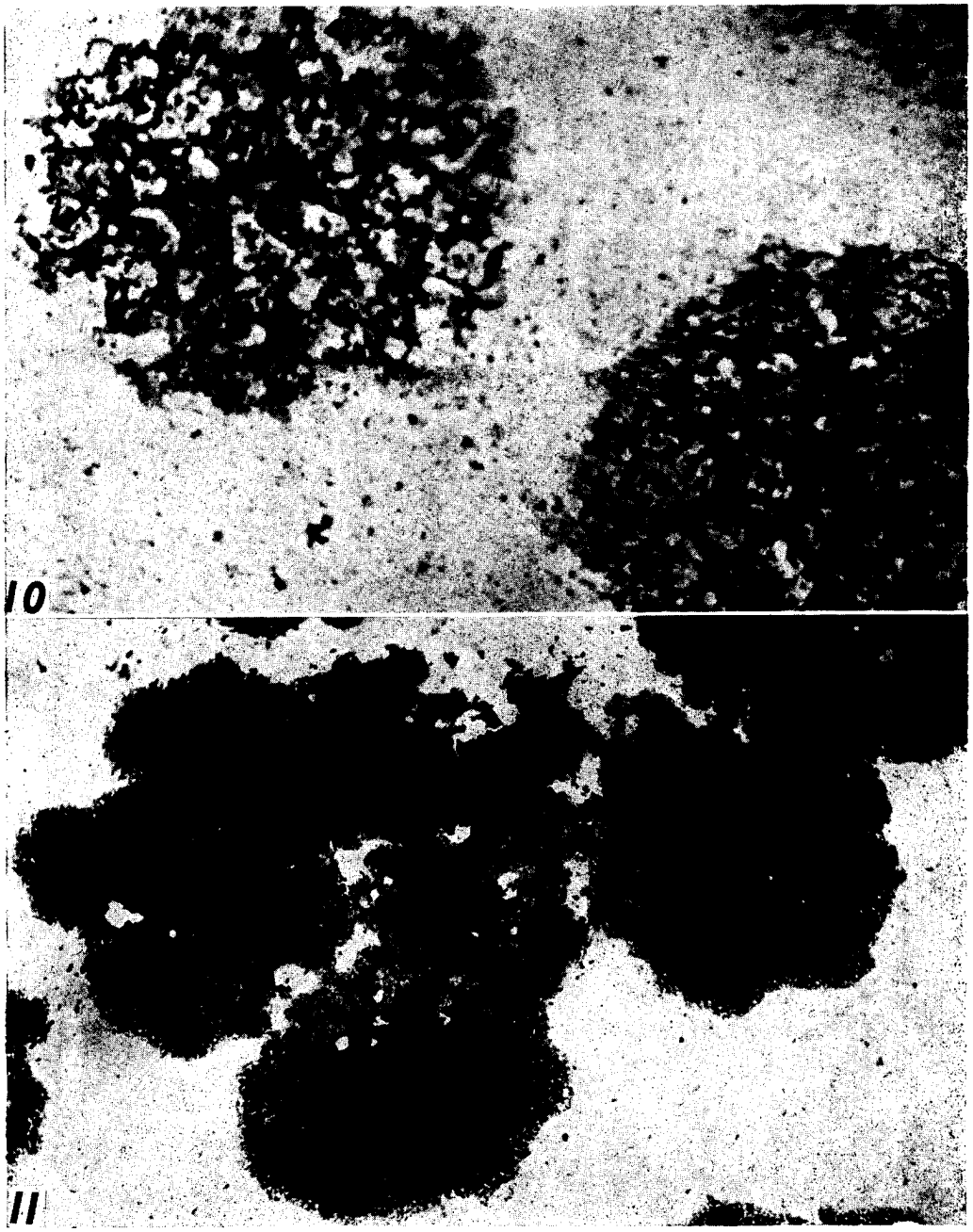


Рис. 10. Действие пенициллина на Палочку Пфейфера при 4-дневной культивации. Распадающиеся L-колонии. Мелкозернистое или коккобациллярное содержимое ККТ изливается в окружающую среду. Увеличение в 850 раз.

Рис. 11. 9-дневная культура палочки Пфейфера на шоколадном агаре. По краям «старых колоний» возникают гнезда вторичных колоний, представляющих переходный тип L-колоний. Наличие ККТ и бактериальных форм. Увеличение в 170 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

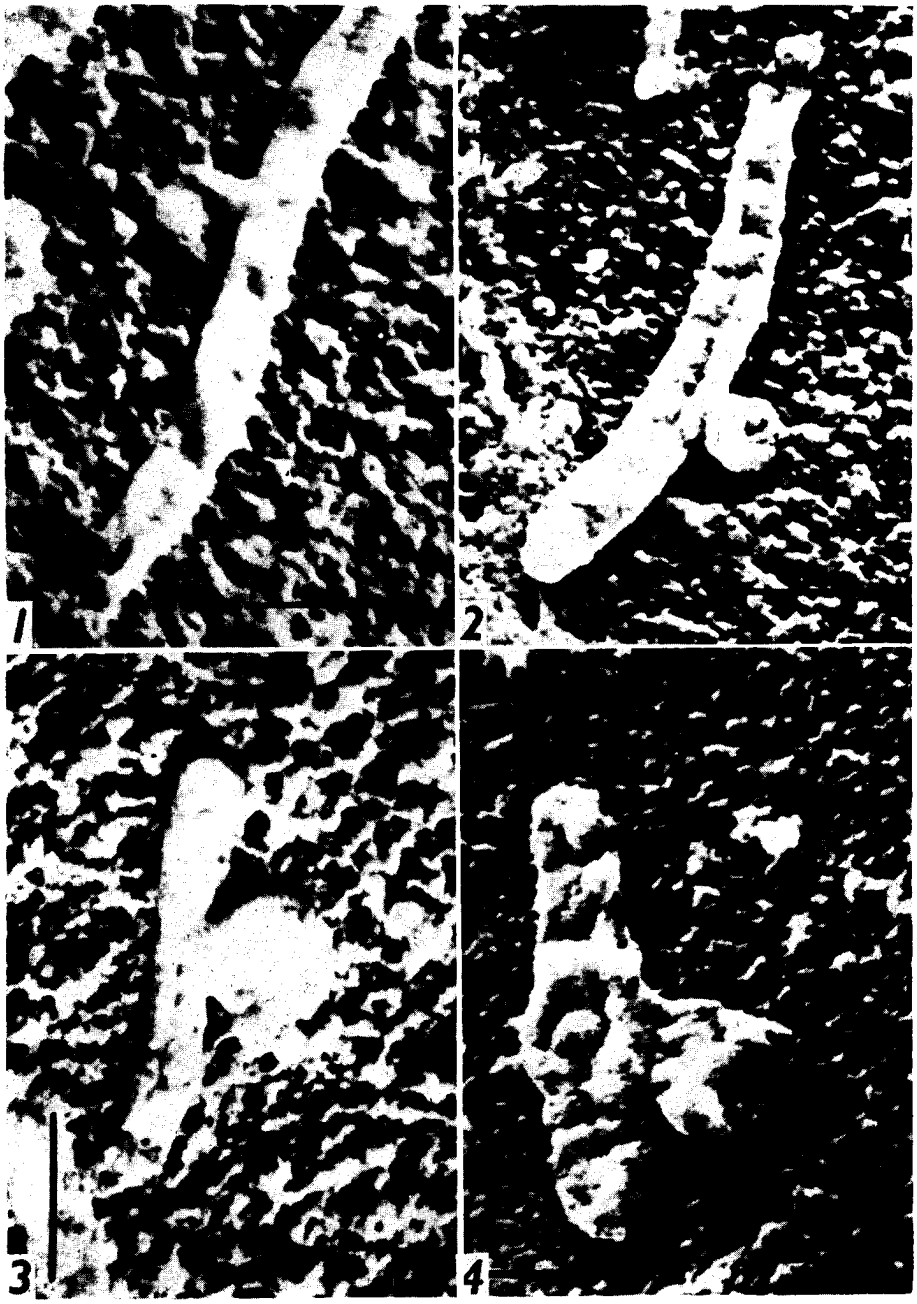
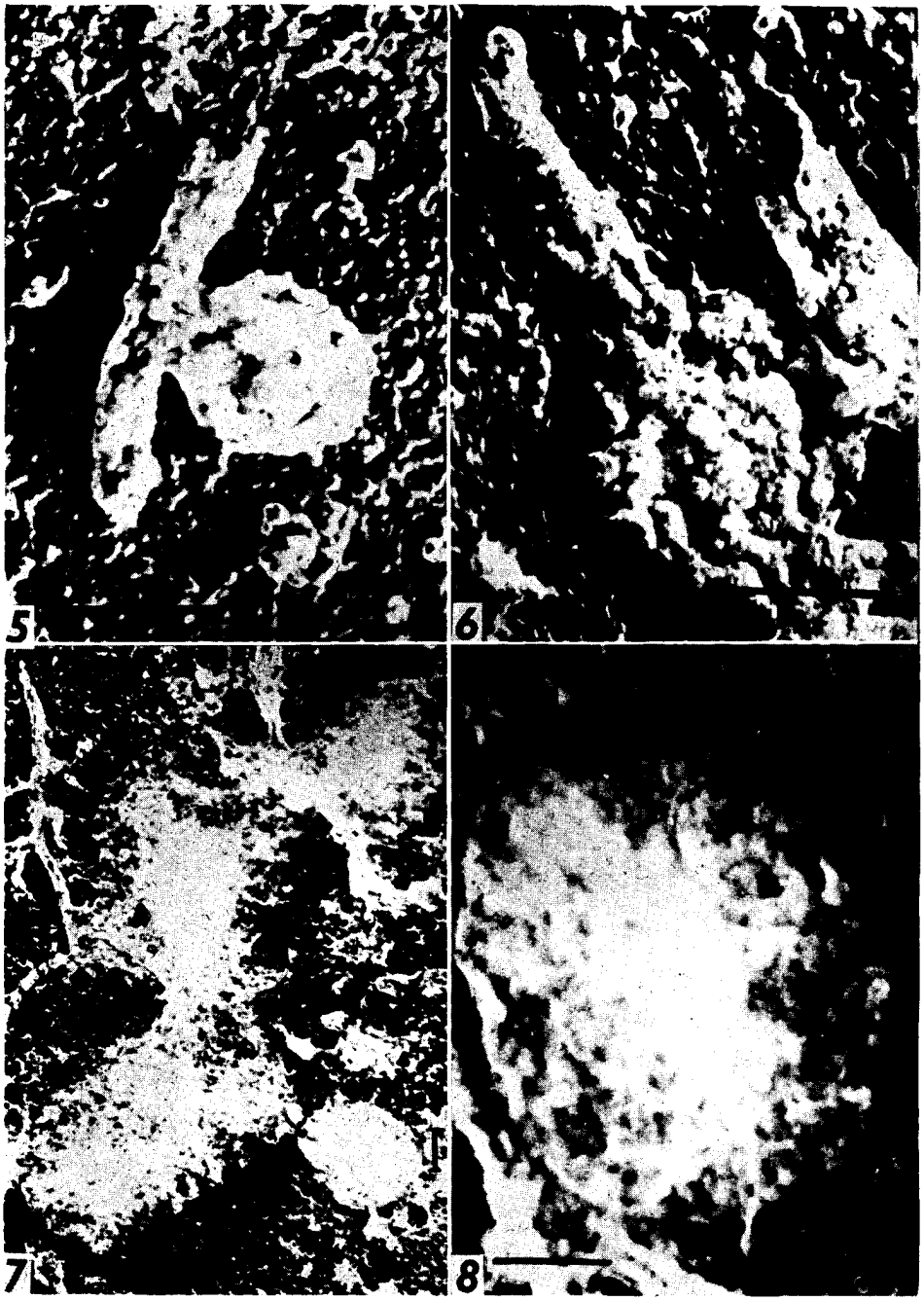


Рис. 1–4. Haemophilus influenzae Pfeiffer. Образование ККТ. Увеличение в 22.000 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2



Палочка Пфейфера. Образование ККТ.
Рис. 5, 6: увеличение в 22.000 раз, рис. 7: увеличение в 5800 раз, рис. 8: увеличение в 15.000 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Рис. 9. Палочка Пфейфера. Образование ККТ. Увеличение в 15.000 раз.

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

(Reprinted from Nature, Vol. 179, pp. 918-919, May 4, 1957)

Effect of Very Large Doses of Bacterial Antigen on Antibody Production in New-born Rabbits

THE injection of large doses of antigen into very young animals results in a weakening of the antibody response when a further dose of antigen is administered to the adult animal. This phenomenon has been described as acquired tolerance[1], immunological approximation[2] or immunological unresponsiveness[3]. It is not yet clear whether the administration of large doses of bacterial antigen during embryogenesis or the first days of postnatal life can also inhibit immunity responses in adult animals. Buxton found a suppression of antibody formation to *Salmonella*[4], and Kerr and Robertson[5] to *Trichomonas foetus*. Cohn[6] and Smith and Bridges[7], on the other hand, found no inhibition of antibody production after the injection of bacterial antigens.

In the present work, five-day old rabbits were injected by the intravascular or intraperitoneal routes with a medium-sized dose (10^8 micro-organisms) of heat-inactivated antigen of *Salmonella paratyphi B*. Further groups of animals were given excessive amounts of the same antigen, the largest possible dose being $4–6 \times 10^9$ organisms for five-day old rabbits and 2×10^9 organisms for new-born rabbits. It is evident from Table 1 that the medium-sized dose of 10^8 organisms caused an antibody response to appear, on the average, at the thirtieth day postnatally. In both groups given excessive doses of antigen, antibody formation was speeded up significantly.

Four months later, all surviving animals were re-vaccinated with 10^7 organisms *S. paratyphi B* (Table 2). Only where excessive doses of antigen had been given to five-day old animals was there a significant inhibition of antibody formation. New-born rabbits injected with 2×10^9 organisms immediately after birth showed no such inhibition on re-vaccination.

These results show that inhibition can be achieved with bacterial antigens, but only when administered in amounts which are very near the lethal dose. The negative results of Cohn[6] and Smith[7] may have been due to the injection of insufficient amounts of bacterial antigen.

Complete inhibition of antibody formation has been achieved with serum albumin, and after the first injections no antibodies were found in the serum of infant animals[9,10]. The present experiments show that not even the injection of excessive doses of

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2

Table 1. POSTNATAL DAY ON WHICH ANTIBODIES WERE FOUND FOR THE FIRST TIME IN INFANT RABBITS AFTER INJECTION OF DIFFERENT AMOUNTS OF ANTIGEN (*S. paratyphi B*)

	To 5-day-old, 10^8 micro-organisms (intraperitoneal)	To 5-day-old, 10^8 intravascular	To 0–1-day-old, 2×10^9 intraperitoneal	To 5-day-old, 2×10^9 intravascular	To 5-day-old, $4–6 \times 10^9$ intraperitoneal
No. of animals	12	14	29	9	21
Median	29	$29 < M < 36$	24	19	15
Min.	29	21	14	14	9
Max.	38	50	59	29	26

Statistical analysis using Wilcox's Test and White's Tables (ref. 8) at a 5 per cent level of significance.

Table 2. HIGHEST TITRES REACHED DURING 21 DAYS AFTER REVACCINATION (WITH *S. paratyphi B*) OF 4-MONTH-OLD RABBITS INJECTED DURING THE FIRST DAYS OF LIFE WITH DIFFERENT AMOUNTS OF THE SAME ANTIGEN

	To 1–5-day-old, $4–6 \times 10^9$ intraperitoneal	0–1-day-old, 2×10^9 intraperitoneal	Controls
No. of animals	13	15	17
Median	16	64	128
Min.	8	32	32
Max.	32	512	512

corpuscular antigens can inhibit an active immunity response in young animals; on the contrary, antibody formation was faster than in the animals given smaller doses. There thus appears to be a difference between the development of antibody reactions to antigens that do little damage (for example, serum proteins) and that of antigens (of endotoxic nature) that do a lot of damage.

Similar results were obtained in puppies. Full details of the present work will be given elsewhere[11].

J. ŠTERZL
Z. TRNKA

Division of Immunology,
Institute of Biology,
Czechoslovak Academy of Science,
Praha 6.

[1] Billingham, R. E., Brent, L., and Medawar, P. B., *Nature*, **172**, 603 (1953).
[2] Hašek, *Csl. biol.*, **2**, 29, 267 (1953); *Nature*, **175**, 763 (1955).
[3] Dixon, F. Y., and Maurer, P. H., *J. Exp. Med.*, **101**, 245 (1955).
[4] Buxton, A., *J. Gen. Microbiol.*, **10**, 398 (1954).
[5] Kerr, W. R., and Robertson, M., *J. Hyg.*, **52**, 253 (1954).
[6] Cohn, M., *Transpl. Bull.*, **3**, 70 (1956).
[7] Smith, R. T., and Bridges, R. A., *Transpl. Bull.*, **3**, 145 (1956).
[8] White, C., *Biometrics*, **8**, 33 (1952).
[9] Hanan, R., and Oyama, J., *J. Immunol.*, **73**, 49 (1954).
[10] Cinader, B., and Dubert, J. M., *Brit. J. Exp. Path.*, **36**, 515 (1955).
[11] Šterzl, J., and Trnka, Z., *Csl. Mikrobiol.* (in the press).

Printed in Great Britain by Fisher, Knight & Co., Ltd., St. Albans

Approved For Release 2008/12/09 : CIA-RDP80T00246A003000320001-2